



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**“GENERACIÓN DE UN SISTEMA EN LEVADURAS QUE RECONSTITUYE LA
REGULACIÓN DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF) DE MAMÍFEROS.
OPTIMIZACIÓN PARA LA BÚSQUEDA DE MODULADORES DE LA ACTIVIDAD
PROLIL HIDROXILASA DE HIF”**

MARÍA LUISA ALCAIDE GERMÁN

MADRID, 2009

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**“GENERACIÓN DE UN SISTEMA EN LEVADURAS QUE RECONSTITUYE LA
REGULACIÓN DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF) DE MAMÍFEROS.
OPTIMIZACIÓN PARA LA BÚSQUEDA DE MODULADORES DE LA ACTIVIDAD
PROLIL HIDROXILASA DE HIF”**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **M^a LUISA ALCAIDE GERMÁN**,
licenciada en Bioquímica, para optar al grado de doctor.

Directores de la tesis:

Dr. Luis del Peso Ovalle

Profesor titular, UAM
Dpto. Bioquímica, Facultad de Medicina.
Instituto Investigaciones Biomédicas
“Alberto Sols”.

Dr. Manuel Ortiz de Landázuri

Catedrático de Inmunología, UAM
Servicio de Inmunología
Hospital Universitario de La Princesa

MADRID, 2009

El presente trabajo ha sido realizado en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de la Princesa y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, en la Universidad Autónoma de Madrid. Ha sido dirigido por el Dr. Luis del Peso Ovalle (Profesor Titular de la UAM) y el Dr. Manuel Ortiz de Landázuri (Catedrático de Inmunología de la UAM), bajo la Tutoría del Dr. Víctor Calvo (Profesor Titular de la UAM).

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a una beca FPU, concedida a M^a Luisa Alcaide Germán por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Estado Español.

A mi familia

La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio.

Gregorio Marañón (1887-1960)

En los momentos de crisis, sólo la imaginación es más importante que el conocimiento.

Albert Einstein (1879-1955)

Agradecimientos

Son muchas las personas a las que me gustaría agradecer su apoyo en esta aventura tan apasionante como difícil. Muchos son los años dedicados a esta empresa, y no siempre he cosechado los frutos deseados. A todos los que os habéis cruzado en mi camino tanto a nivel personal como científico: GRACIAS.

En primer lugar quisiera agradecer de forma muy especial a los Dres. Manuel Ortiz de Landázuri y Luis del Peso Ovalle por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección. A lo largo de estos años vuestros consejos me han resultado muy útiles en esta carrera de fondo. Sin duda, el desarrollo de mi tesis no habría sido posible sin vosotros.

Gracias a todo el personal del Servicio de Inmunología del Hospital de La Princesa, donde comencé mi andadura científica hace algo más de cuatro años. En especial a Alicia Vara por su enorme apoyo y su gran paciencia al trasladarme todo su conocimiento en el trabajo con levaduras. Ali, muchas gracias por toda la ayuda experimental que has prestado en este proyecto y por tus sabios consejos, sin ti no habría sido posible... A todos los veteranos: Yolanda, Salva, Elisa, Silvia, Mariano..., gracias. Todos me habéis aportado algo positivo en este período. No podría dejar de recordar a mis compañeros de batallas en “la Prince”: Bárbara, Ainara, Ferni Mónica, Ángel,... y a todo “Hi-Tech” y “New Lab” por esos momentos de ciencia y trabajo salpicados siempre con risas y buen humor.

Al grupo del Dr. Sánchez Madrid, Román, Noa, Olga, Hortensia, Manu, Isa...; a la gente de rutina; al grupo de Cecilia: Manu y Sonia; y a Anita y Merche de reuma. Gracias por todos los buenos momentos que habéis compartido conmigo. Y por supuesto a Arancha, Amalia, Marta y Javi, mis *PACO'S* preferidos, por todas las “risas y llantos” que hemos compartido durante este tiempo ¡Gracias chicos!

Es turno ahora de aquellos que más me han sufrido... ¿Recordáis esa mudanza al laboratorio 252? Con Luis a la cabeza, Nuria, Diego, Amaya, Silvia y yo fuimos los primeros habitantes del nuevo laboratorio. ¿Qué puedo decir de vosotros?... Realmente sois con los que más momentos he vivido durante estos años. Nurita y Amaya (no podía separaros) gracias por vuestro apoyo en los momentos difíciles y por los buenos momentos que hemos vivido juntas tanto dentro como fuera del labo. Silvita, muchísimas gracias por todo tu apoyo, esas tandas de interferencias, PCRs y western interminables en los últimos proyectos de la tesis hubieran sido menos llevaderos sin tu ayuda. Soraya, gracias por ser como eres y haber compartido con nosotros tu gran humanidad. También a Eva y María, vuestro paso por el laboratorio ha sido breve pero muy gratificante. Diego, ¿Cómo podría agradecerte en un espacio tan breve?... Has estado ahí desde el principio, cuando me vine a Madrid a hacer bioquímica y todo era nuevo para mí. Buen amigo y compañero y gran científico. Eres una persona muy valiosa y espero que nuestra amistad siga siempre viva, significas mucho para mí.

De mi etapa en biomédicas, quiero agradecer especialmente la acogida recibida por parte de nuestros vecinos del 251. Gracias Benilde. Y gracias Jose y Asun, por ser tan salaos y buena gente ¡Qué momentos más graciosos me habéis hecho pasar! Y mi malagueña preferida, Bea, muchísimas gracias por todos tus consejos personales y profesionales, los valoro de verdad.

Y esa “vidilla” de los “campaneros” Irene, Josué y María, gracias por hacerme sentir como en casa desde el primer momento... Gracias Alberto Zambrano por su buen humor, Anita (del 2.1.) por esas conversaciones y al grupo de A. Muñoz: Oscar, Toño, Pepa, Paloma... Biomédicas no sería lo mismo sin vosotros.

A Paco Portillo y al labo de Amparo Cano: Héctor, Mathew, Verónica, Amalia... ha sido un placer compartir parte de este camino con vosotros. A Claudia, por tu dulzura y cercanía. También me gustaría agradecer a Jaime Renart su disposición para ayudar siempre y concretamente los consejos y el apoyo que me ha brindado siempre que he necesitado.

Me gustaría agradecer el apoyo q nos prestan todos los servicios del IIB. Fernando, por aguantarme estos meses dando la brasa en la biblioteca. A los chicos de imagen e informática. Al personal de cultivos. Al personal de seguridad... Entre todos mejoráis el día a día en el centro.

A mis compañeros de carrera y amigos Richard, Diego “Ávila” y Alberto. Cuando empezamos esta aventura no podíamos imaginar qué caminos tan distintos tomaríamos... También a mis compañeros y profesores de Química, en especial a Pablo Blanco, mi tutor.

Y por supuesto a mis compañeros de piso pasados y presentes: Inday, Ali, Patri, Alex, Servando (qué ricas tus comidas). Gracias por compartir lo bueno y lo malo. Aunque la tesis no me dejara mucho tiempo para vosotros, habéis sido mi familia aquí en Madrid.

Me alejo ahora de Madrid para dirigirme a Calzada de Calatrava, mi pueblo. Gracias a todos “*los bandarras*” por ser como sois y por todo lo que hemos compartido juntos. Esos días de campo, casas rurales, despedidas... ¡Cuantas risas! Gracias Ravasán, por el gran apoyo que me has dado en los momentos difíciles.

A las personas que siempre me han apoyado de forma incondicional, mi familia: Gracias. Vosotros habéis sido mi pilar, mi punto de partida y de referencia. Esta tesis os la dedico a vosotros; a mis abuelos, tíos y primos, a las titas... en definitiva a la familia Germán y “agregados”. Todos sois muy especiales para mí.

Finalmente, gracias a vosotros: Papá, mamá y Antonio (“chachillo”...jaja) por estar conmigo en los buenos momentos y también en los difíciles, por ayudarme a levantarme cuando me he caído y por animarme siempre y darme aliento para que no me rinda.

Resumen/Abstract

El oxígeno es esencial para la mayoría de seres vivos. Por esta razón, las células de organismos multicelulares han desarrollado una maquinaria molecular especializada cuya función es mantener la homeostasis de oxígeno. Entendemos por hipoxia el fenómeno que tiene lugar cuando se descompensa el equilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno de un tejido. Cuando esto ocurre, se activa un programa de expresión génica implicado en la adaptación celular a la nueva situación. Gran parte de los genes regulados en respuesta a hipoxia están bajo el control del factor de transcripción inducible por hipoxia, HIF. El oxígeno regula la estabilidad de HIF gracias a la acción de una familia de dioxigenasas (EGLNs) que utilizan O₂ como cosustrato y actúan como sensores celulares de oxígeno. En presencia de oxígeno, estas enzimas hidroxilan la subunidad HIF- α en dos residuos conservados de prolina. HIF hidroxilado es reconocido y ubiquitinado por el producto del gen supresor de tumores pVHL, dirigiéndolo al proteosoma para su degradación. En hipoxia, la hidroxilación catalizada por las EGLNs se ve comprometida por la falta de oxígeno, estabilizándose HIF y activando la transcripción de sus genes diana. Muchas patologías humanas como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares cursan con hipoxia, y su progresión se puede ver influenciada por la activación de los genes diana de HIF. Por ello, tanto HIF como las proteínas implicadas en su regulación emergen como potenciales dianas terapéuticas. Además, las EGLNs, como sensores celulares de oxígeno, pueden tener otras dianas distintas de HIF. En este trabajo hemos desarrollado un sistema que reproduce fielmente la regulación de HIF en un contexto celular. Este sistema constituye una valiosa herramienta para estudiar la regulación de HIF y la bioquímica de las EGLNs. Esta herramienta también puede explotarse para identificar nuevas dianas de las EGLNs. Por último, en este trabajo demostramos que este sistema puede utilizarse para identificar moduladores específicos de la actividad EGLN.

Oxygen is essential for life in a wide range of organisms. For this reason, cells have developed a molecular machinery aimed to maintain the oxygen homeostasis. Hypoxia takes place with an unbalance between oxygen supply and demand. In such a situation, cells activate a genetic program in order to adapt to the new conditions and return to equilibrium. Most of the genes induced by hypoxia are regulated by the Hypoxia Inducible transcription Factor (HIF). Oxygen regulates HIF stability through a family of dioxygenases termed EGLNs. These enzymes hydroxylate the alpha subunit of HIF in specific proline residues in an oxygen-dependent reaction. Hydroxylated HIF is then recognized and ubiquitinated by the product of the tumor suppressor gene, pVHL, leading to its proteosomal degradation. Under hypoxia, the hydroxylation of HIF by the EGLNs is compromised due to the lack of oxygen. Therefore, HIF escapes degradation and drives the transcription of its target genes. Several human pathologies, including cancer and ischemic cardiovascular diseases, curse with hypoxia, and their progression might be influenced by activation of HIF-target genes. For this reason, either HIF or its regulatory proteins have been proposed as potential therapeutic targets. Furthermore, EGLNs as cellular oxygen sensors may have other targets besides HIF. The system described in this work accurately reconstitutes HIF regulation while preserving EGLN substrate specificity. Thus, it is a valuable tool to study HIF regulation and EGLN biochemistry in a cellular context. This system might be useful to identify new EGLNs substrates. In addition, we demonstrate that this system can be used to identify specific inhibitors of the EGLN enzymes.

Índice

• ABREVIATURAS	23
• INTRODUCCIÓN	27
1. LA HIPOXIA CELULAR	29
2. HIF. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	30
3. REGULACIÓN DE HIF POR LOS NIVELES DE OXÍGENO	32
3.1 INTERACCIÓN HIF-VHL	34
3.2 SÍNDROME DE VHL	35
4. SENSORES DE OXÍGENO. HIDROXILASAS DE HIF: EGLNs y FIH	36
4.1 REGULACIÓN DE LAS EGLNs	38
4.2 OTROS SUSTRATOS DE LAS EGLNs	40
4.3 MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROXILASA POR INONES Y METABOLITOS	40
5. REGULACIÓN DE HIF INDEPENDIENTE DE OXÍGENO	42
6. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA RUTA DE HIF	42
6.1 ENSAYOS DE ACTIVIDAD PROLIL-HIDROXILASA DE HIF	44
• OBJETIVOS	45
• MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. REACTIVOS Y MEDIOS	51
2. CULTIVOS CELULARES	51
3. DESCRIPCIÓN DE LA CEPA AH109 Y EL SISTEMA DOBLE Y TRIPLE HÍBRIDO EN LEVADURAS	52
4. CLONAJES	53
5. WESTERN BLOT DE LEVADURAS	56
6. ENSAYOS DE TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN IN VITRO	57
7. ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS	58
8. ENSAYOS DE CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO	60
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	63
• RESULTADOS	65
1. GENERACIÓN DE UN SISTEMA BASADO EN TRIPLE HÍBRIDO EN LEVADURAS QUE RECONSTITUYE LA REGULACIÓN DE HIF	67
1.1 CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS	67
1.2 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA	68
2. SISTEMA TRIPLE HÍBRIDO “HIF/EGLN/VHL” CÓMO HERRAMIENTA PARA IDENTIFICAR INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE LAS EGLNs	72
2.1 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA CONTROL	72

3. ADAPTACIÓN DEL SISTEMA A MEDIO LÍQUIDO	74
3.1 DETERMINACIÓN DEL RANGO LINEAL DE CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO	74
4. VALIDACIÓN DEL SISTEMA TRIPLE HÍBRIDO COMO HERRAMIENTA PARA IDENTIFICAR MODULADORES DE LAS EGLNs	75
5. OTROS MODULADORES DE LAS EGLNs	79
5.1 15d-PGJ₂, ¿UN INHIBIDOR DE LAS EGLNs?	79
5.2 R59949. ¿UN ACTIVADOR DE LA ACTIVIDAD HIDROXILASA?	81
6. SISTEMA DOBLE HÍBRIDO EGLN3/HIF	83
6.1 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DOBLE HÍBRIDO	84
• DISCUSIÓN	89
• CONCLUSIONES	97
• BIBLIOGRAFÍA	101
• PUBLICACIONES	113

Abreviaturas

15d-PGJ2: *15-deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J₂*

2-OG: 2-Oxoglutarato.

AD: Dominio de Activación de Gal4.

ARNT: *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*, Translocador nuclear del receptor para aril hidrocarburos.

BD: Dominio de unión a DNA de Gal4.

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

C-ODD: ODD Carboxi-terminal

C-TAD: *C-terminal Transactivation Domain*, Dominio de transactivación carboxi-terminal.

DMOG: Dimetil-oxalil-glicina.

EGLN: *Egg laying defective-nine (Caenorhabditis elegans gene) Homolog*, Homólogo del gen EGL9. EGL9 es una prolil hidroxilasa que actúa sobre el ortólogo de HIF en *C. elegans*, regulando su actividad.

EPAS: *Endothelial PAS protein*, Proteína con dominio PAS (Per-ARNT-Sim) expresada en endotelio.

EPO: *Erythropoietin*, Eritropoyetina.

FcεR1γ: Receptor tipo Iγ de la InmunoglobulinaE

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

HIF: *Hypoxia-inducible factor*, Factor inducible por hipoxia.

HPH: *HIF prolyl hydroxylase*, prolil hidroxilasa de HIF.

HRE: *Hypoxia- response element*, Elemento de respuesta a Hipoxia.

iNOS: *inducible Nitric Oxide Synthase*, Oxido Nítrico Sintasa inducible.

IPAS: *Inhibitory PAS Domain Protein*, Proteína Inhibidora con dominio PAS.

ITAM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*, Motivo de activación basado en el inmunoreceptor de Tirosina.

LCK: *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*, proteína tirosina quinasa específica de linfocitos.

N-ODD: ODD amino-terminal.

N-TAD: *N-terminal Transactivation Domain*, Dominio de transactivación amino-terminal.

ODD: *Oxygen-dependent degradation domain*, Dominio de degradación dependiente de oxígeno.

PDK: Pyruvate dehydrogenase kinase, Quinasa de la Piruvato Deshidrogenasa.

PHD: *Prolyl-4-hydroxylase domain*, dominio proli-4 hidroxilasa.

ROS: *Reactive oxygen species*, Especies reactivas de oxígeno.

SH2: *Src-Homology domain 2*, dominio de homología al dominio 2 de la proteína Src.

SYK: *Spleen tyrosine kinase*, Tirosina quinasa de bazo.

TAD: *Transactivation Domain*, Dominio de transactivación.

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

VHL: *von Hippel-Lindau protein*, proteína codificada por el gen supresor de tumores causante del síndrome de von Hippel Lindau.

Introducción

1. LA HIPOXIA CELULAR

El cambio en la composición de una atmósfera reductora, hace unos 2000 millones de años, a una atmósfera oxidante rica en oxígeno gracias a la aparición de organismos fotosintéticos oxigénicos, condicionó la evolución de la vida en La Tierra. El oxígeno, si bien resultaba tóxico para la mayoría de formas de vida, permitió el desarrollo de formas de obtención de energía más eficientes por parte de los organismos quimioheterótrofos. La alta eficacia del metabolismo oxidativo supuso una gran ventaja evolutiva que tuvo como consecuencia una rápida expansión y diversificación de las especies aerobias [1]. Por otra parte, el metabolismo oxidativo permitió la aparición de formas de vida complejas y con altos requerimientos de energía, tales como los animales superiores. En éstos, en torno al 90% del oxígeno es consumido como aceptor de electrones en la cadena respiratoria para generar ATP [2]. Puesto que el oxígeno es central en el metabolismo de los organismos aerobios, no es de extrañar que éstos hayan desarrollado a lo largo de la evolución complejos mecanismos encaminados a mantener su homeostasis. Así, los animales superiores han desarrollado sistemas tan sofisticados como los aparatos circulatorio y respiratorio que actúan coordinadamente para asegurar el aporte necesario de oxígeno a todos sus tejidos. Cuando el aporte de oxígeno es insuficiente frente a la demanda requerida por el organismo, se genera una situación denominada hipoxia. Los organismos superiores han desarrollado ciertas estructuras especializadas como son el cuerpo carotideo, las arterias pulmonares y los cuerpos neuroepiteliales de las vías aéreas que son capaces de detectar pequeñas variaciones en la pO_2 sanguínea y desencadenar una respuesta inmediata implicada en restablecer el aporte de oxígeno (mediante el aumento de la frecuencia cardíaca y el ritmo respiratorio, entre otros mecanismos). Esta respuesta aguda no requiere transcripción e implica cambios en la actividad de canales iónicos [3, 4]. Cuando la hipoxia se prolonga en el tiempo, las células activan un programa génico encaminado por un lado a restaurar el aporte adecuado de oxígeno y por otro a reprogramar el metabolismo aerobio a un metabolismo anaerobio que suponga un ahorro de oxígeno para la célula. La principal ruta celular implicada en la respuesta adaptativa a hipoxia es la del factor de transcripción inducible por hipoxia, HIF [5, 6]. HIF se estabiliza en hipoxia modulando la transcripción de más de 100 genes implicados en la homeostasis de oxígeno (Figura 1) [7, 8]. A grandes rasgos estos genes se pueden englobar en dos grupos principales: los implicados en favorecer el transporte de oxígeno mediante angiogénesis (VEGF), vasodilatación (iNOS), producción de eritrocitos (EPO),

transporte de hierro (transferrina) y aquellos implicados en la represión del metabolismo oxidativo de la glucosa (PDK) y aumento de la glicólisis anaerobia (prácticamente todos los enzimas glicolíticos además de los transportadores de glucosa y lactato) [9, 10].

A pesar del requerimiento absoluto del oxígeno en organismos superiores, su utilización como fuente de energía conlleva ciertos riesgos derivados de la naturaleza altamente reactiva de esta molécula. La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por encima de los niveles tolerados por la célula supone un gran riesgo para la viabilidad celular [11, 12]. En este sentido, la adaptación metabólica promovida por HIF disminuye tanto el consumo de O₂ como la producción de ROS [13-15] aminorando el daño oxidativo provocado por estas moléculas.

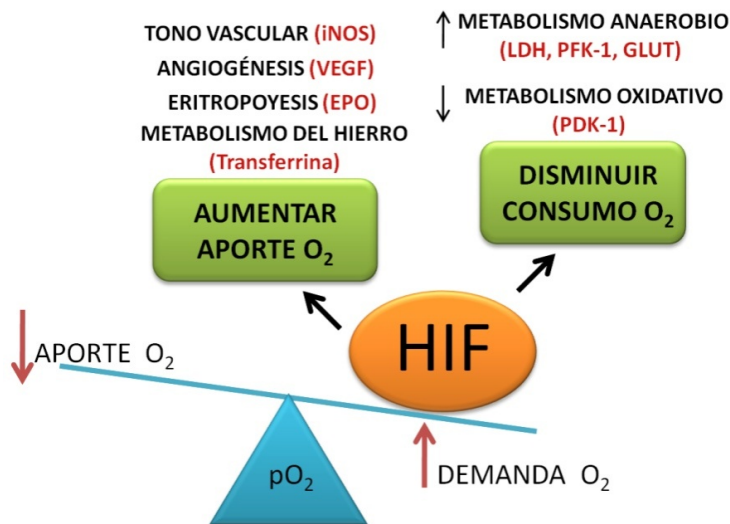


Figura 1. Respuesta transcripcional de HIF ante la falta de oxígeno. Esquema general de la respuesta transcripcional activada por HIF ante una situación de falta de oxígeno. De modo general, esta respuesta está dirigida a aumentar el aporte de O₂ controlando el tono vascular y promoviendo eritropoyesis, aporte de hierro y angiogénesis, y por otro lado reduce el consumo de O₂ promoviendo el cambio a metabolismo anaerobio.

2. HIF: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

HIF está presente tanto en el genoma de invertebrados simples como *Caenorhabditis elegans*, formado por unas 10³ células a las que el O₂ llega por difusión simple, en invertebrados más complejos como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, en la que el O₂ se distribuye a todo el cuerpo por un entramado de tubos traqueales especializados, como en vertebrados complejos como *Homo sapiens*, formado por más de 10¹³ células que son abastecidas con O₂ gracias a la acción combinada de los sistemas circulatorio y respiratorio, altamente complejos y especializados.

Los factores de transcripción HIF son heterodímeros formados por dos subunidades (una subunidad HIF- α y otra HIF- β) de la familia PAS (PER, ARNT y SIM) *helix-loop-helix* [7, 16, 17]. Como se muestra en la Figura 2, tanto los dominios PAS como bHLH, implicados en heterodimerización de proteínas y unión a DNA respectivamente, se encuentran conservados en ambas subunidades. En cambio, tanto el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), que contiene dos residuos críticos de prolina, como los dominios de transactivación amino y carboxilo terminales (N-TAD y C-TAD respectivamente) están presentes únicamente en las subunidades alpha.

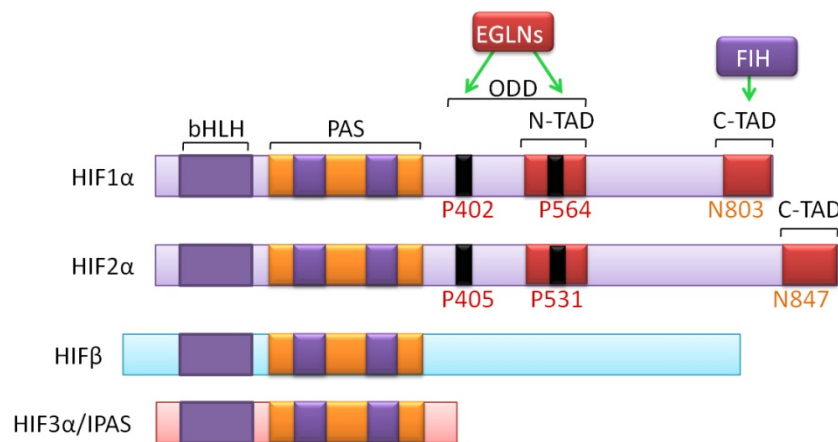


Figura 2. Dominios estructurales de las principales isoformas de HIF. Los dominios bHLH (*basic helix-loop-helix*) y PAS (Per-ARNT-Sim) implicados en la unión a DNA y heterodimerización (entre subunidades alpha y beta) respectivamente. N-TAD y C-TAD: dominios de transactivación amino y carboxi-terminales. En el dominio C-TAD se encuentra la Asparagina susceptible de hidroxilación por FIH. ODD: Dominio de degradación dependiente de oxígeno. En este dominio se encuentran las prolinas susceptibles de hidroxilación por las EGLNs.

El heterodímero HIF- α /HIF- β se une a secuencias consenso G/ACGTG en los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) situados en las regiones reguladoras de sus genes diana. En estas secuencias, HIF interacciona con coactivadores y/u otros factores de transcripción para modular la transcripción de sus genes diana, implicados en la respuesta celular adaptativa a hipoxia [18, 19]. Existen tres isoformas HIF- α codificadas en distintos locus génicos. HIF-1 α y HIF-2 α presentan una estructura y regulación similares, mientras que HIF-3 α está peor caracterizado debido en gran parte a las numerosas isoformas para las que codifica. Parece que una de las isoformas de HIF-3 α (IPAS) tiene un claro papel inhibitorio de la transcripción mediante la unión a HIF-1 α , impidiendo así la formación del heterodímero funcional HIF α / β [20, 21].

HIF es absolutamente necesario para el desarrollo embrionario. Así, la falta de HIF-1 en ratones conlleva a la muerte en los primeros estadios de desarrollo embrionario debido a la falta de placentación y a la formación de un sistema circulatorio aberrante [22-24]. Sin embargo, los ratones deficientes en HIF-2 α , suelen sobrevivir hasta avanzados estadios de desarrollo embrionario o incluso un elevado porcentaje (en función del fondo genético) nacen vivos. Por lo tanto, a pesar de la elevada homología entre la secuencia aminoacídica, los dominios estructurales y los mecanismos de activación en hipoxia entre HIF-1 α y HIF-2 α , estas dos isoformas realizan diferentes funciones fisiológicas. [22, 25, 26].

3. REGULACIÓN DE HIF POR LOS NIVELES DE OXÍGENO

El principal mecanismo que regula la actividad de HIF ocurre a nivel post-traducciona l en función de la disponibilidad de oxígeno. La regulación dependiente de oxígeno del factor HIF acontece sobre la subunidad HIF- α . La subunidad HIF- β o ARNT es una proteína nuclear de expresión constitutiva no regulada por oxígeno y que participa en otros procesos celulares heterodimerizando con otros miembros de la familia PAS [27].

El oxígeno regula tanto la vida media como la actividad transcripcional de las proteínas HIF- α . Ambos efectos están mediados por hidroxilación en residuos específicos de esta subunidad, lo que modifica su capacidad de interacción con otras proteínas. En la Figura 3 se resume la regulación de HIF por oxígeno. La hidroxilación por parte de FIH (*Factor Inhibiting HIF*) en un residuo conservado de asparagina (N803 en la proteína HIF-1 α humana) dentro del dominio de transactivación C-terminal evita su interacción con el coactivador de la transcripción p300 [28]. Por otro lado, la hidroxilación en al menos un residuo conservado de prolina (P402 y P564 en HIF-1 α humano) dentro del dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) de las proteínas HIF- α permite su unión a pVHL (el cual forma parte de un complejo E3 ubiquitil ligasa) que lo dirige al proteosoma para su degradación [29-31]. Esta hidroxilación en residuos de prolina es llevada a cabo por las enzimas EGLNs (*EGL-nine homologues*), que al igual que FIH pertenecen a una familia de dioxigenasas que requieren oxígeno molecular, Fe²⁺ y 2-oxoglutarato para catalizar la reacción [32-36]. Dados los cosubstratos requeridos por las EGLNs y FIH, tanto la hipoxia, como los quelantes de hierro y los análogos del 2-oxoglutarato comprometen su actividad [37] [38]. En estas circunstancias, un gran

porcentaje de moléculas de HIF- α escapan a la hidroxilación y consiguiente degradación, estabilizándose dicha proteína en el citoplasma. A continuación, HIF- α se transloca al núcleo donde heterodimeriza con HIF- β [39] a través de los dominios PAS. Ya en el núcleo, el heterodímero α/β se une a las regiones consenso en el DNA (HRE) y se asocia con los coactivadores transcripcionales p300/CBP para regular la transcripción de sus genes diana (Figura 3).

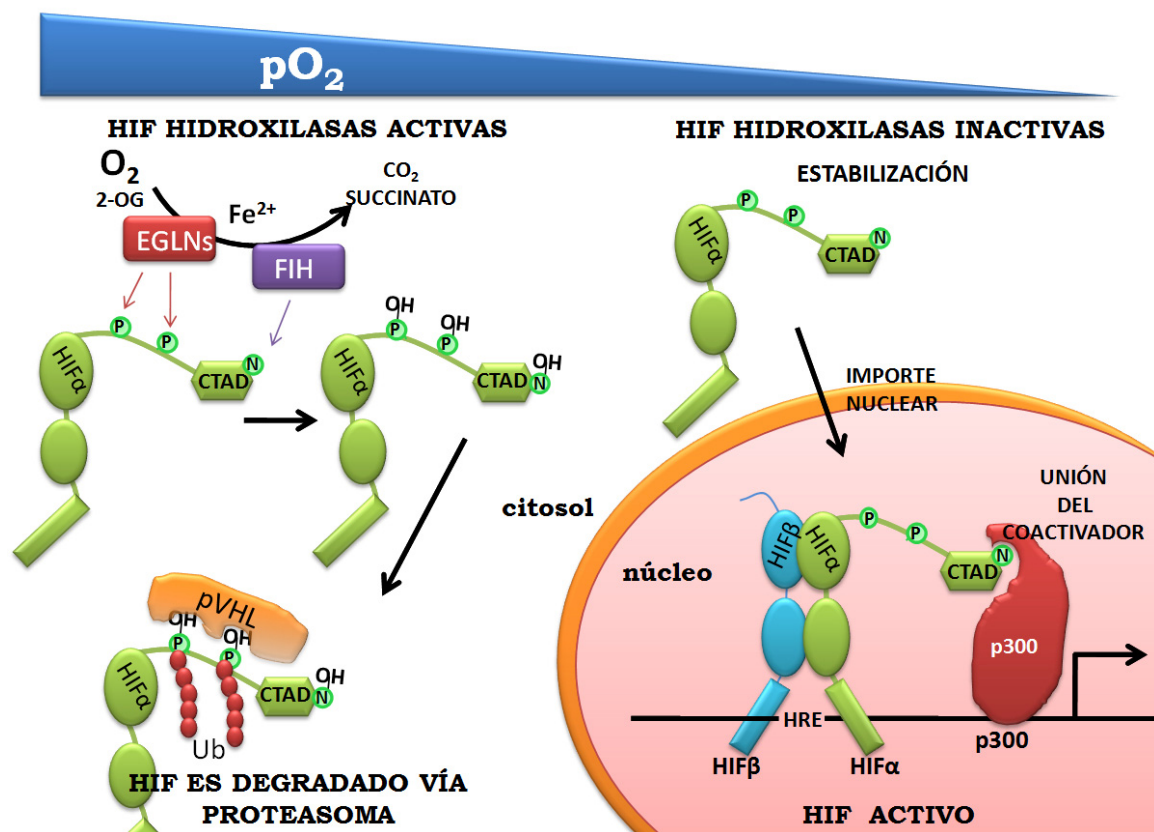


Figura 3. Esquema de la regulación de HIF por hipoxia. HIF se compone de dos subunidades HIF- α y HIF- β . En presencia de oxígeno HIF- α es hidroxilado en dos residuos conservados de prolina (contenidos en el ODD, véase Figura 1) y un residuo de asparagina ubicado en el CTAD (Figura 1). La hidroxilación en prolinas es llevada a cabo por una familia de prolil-hidroxilasas (EGLN1-3). Esta modificación postraduccional permite el reconocimiento de HIF por parte de pVHL que dirige a HIF al proteosoma para su degradación. La hidroxilación en asparagina, por parte de FIH, impide la unión del coactivador transcripcional p300/CBP. Cuando el oxígeno es limitante disminuye la hidroxilación de prolina y asparagina, lo que permite la estabilización de HIF- α y unión a HIF- β así como el reclutamiento de p300/CBP activando así la transcripción de genes diana de HIF. 2-OG: 2-oxoglutarato.

En resumen, la regulación de HIF- α por los niveles de oxígeno es dual. Por un lado la estabilidad de la proteína está controlada por las EGLNs gracias a la hidroxilación en normoxia de residuos conservados de prolina situados en el ODD de HIF- α . Esta modificación genera un sitio de unión para pVHL, proteína integrante de un complejo E3 ubiquitil ligasa, que dirige a HIF- α al proteasoma para su degradación. Por otro lado, la actividad transcripcional de HIF está regulada por oxígeno gracias a la hidroxilación en un residuo conservado de asparagina por la enzima FIH. Esta modificación impide la unión de HIF- α al coactivador p300 disminuyendo así la actividad transcripcional en normoxia. La regulación de la estabilidad de HIF es, lógicamente, dominante sobre la regulación de su actividad transcripcional y es, muy probablemente, la forma fundamental de regulación de HIF.

Además de esta ruta canónica bien caracterizada, se han descrito otras modificaciones pos-traduccionales que posiblemente modulan la regulación de HIF por oxígeno. Entre éstas se encuentran fosforilaciones, sumoilación [19], acetilación [40] o interacción con HSP90 [41]. La contribución de estas señales deberá ser esclarecida en el futuro.

3.1 INTERACCIÓN HIF-VHL

El gen de VHL codifica para una proteína de 213 aminoácidos y un peso molecular de unos 30 kDa [42] y una isoforma con un peso molecular aparente de 19 kDa, que parece predominar en muchos tejidos [43]. Usaremos los términos pVHL ó VHL para referirnos de modo genérico a ambas proteínas. La proteína VHL forma complejos con elongina B y cullina 2 que se asemejan estructuralmente a las ubiquitin ligasas de levaduras SCF (proteínas Skp1-Cdc53-F-Box). Estos complejos poliubiquitilan proteínas diana que son entonces degradadas por el proteasoma. En función de su composición en estructura secundaria se diferencian dos regiones en la proteína VHL: el dominio α y el dominio β (Figura 4). El primero interacciona con las elonginas B y C formando el complejo VBC. Por su parte, el dominio β confiere especificidad de sustrato a todo el complejo, uniéndose directamente a la subunidad HIF- α y dirigiendo su poliubiquitilación para su posterior destrucción por el proteasoma. Como se ha comentado anteriormente, esta interacción HIF- α /pVHL sólo se produce previa hidroxilación de uno de los residuos conservados de prolina contenidos en el ODD de

HIF- α [30, 31, 44]. El grupo hidroxilo media la interacción pVHL/HIF- α participando en enlaces de hidrógeno con dos residuos localizados en el dominio β de pVHL [45, 46] (Figura 4). Es suficiente la presencia de una sola prolina (contenida en el C-ODD o el N-ODD de HIF) para que el péptido sea reconocido por VHL y poliubiquitilado [45].

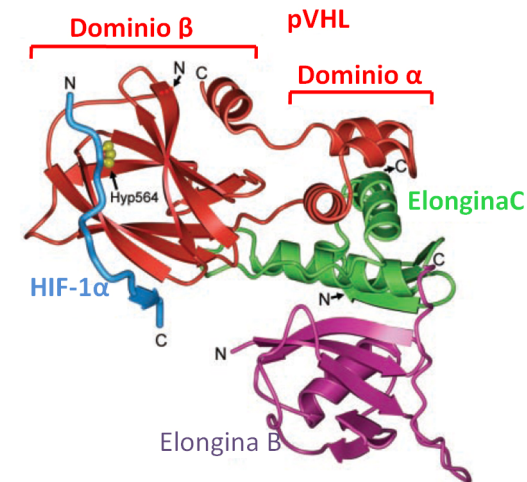


Figura 4. Diagrama de la unión pVHL-HIF-1 α . Modelo de la estructura del complejo VBC (pVHL-Elongina B-Elongina C) unido al fragmento de 15 residuos contenido en el C-ODD de HIF-1 α . En pVHL se diferencian dos dominios (α y β) en base a su composición en estructura secundaria. El péptido de HIF hidroxilado es reconocido por el dominio beta de pVHL. El fragmento de HIF-1 α que adopta conformación de lámina beta se indica con una flecha. HIF-1 α está en azul, la hidroxiprolina 564 en amarillo, pVHL en rojo, Elongina B en magenta y Elongina C en verde [46].

El gran peso de esta ruta de ubiquitinación mediada por pVHL sobre el control de la estabilidad de HIF- α en normoxia, se pone de manifiesto en modelos murinos donde la inactivación condicional de *Vhl* provoca una robusta activación de HIF [47].

3.2 SÍNDROME DE VON HIPPEL LINDAU

Cabe hacer una mención especial al síndrome de von Hippel-Lindau. Esta enfermedad, causada por mutaciones en el gen supresor de tumores VHL, está asociada a un mayor riesgo de padecer una amplia variedad de tumores de forma alelo-específico. Así, mutaciones en la línea germinal de uno de los alelos de VHL pueden cursar con el desarrollo de carcinoma renal de célula clara, hemangioblastomas y feocromocitomas, entre otros, tras la inactivación del alelo remanente. Por otro lado, la pérdida de VHL, en ausencia de mutaciones en la línea germinal, es un fenómeno muy frecuente en carcinomas renales de célula clara (80% de los casos). De hecho, parece que la acumulación aberrante de HIF- α juega un importante papel en los carcinomas renales

VHL^{-/-}. Sin embargo, la proteína VHL tiene otras funciones además de controlar la estabilidad de HIF- α . Entre ellas, cabe destacar el control de la formación de la matriz extracelular [48]. Se ha descrito que VHL se une directamente tanto a fibronectina [49] como al colágeno IV hidroxilado [50, 51]. Estudios in vitro revelan la incapacidad de células deficientes en VHL para ensamblar correctamente fibronectina en la matriz extracelular, esta función de VHL parece independiente de HIF [52, 53]. Además, estudios in vivo han puesto de manifiesto la incapacidad de las células deficientes para VHL de organizar correctamente la matriz extracelular [54, 55].

La descripción de funciones celulares afectadas por la pérdida de VHL de una forma HIF independiente pone de manifiesto la existencia de otras dianas de VHL. En este sentido se ha descrito la interacción que tiene lugar entre pVHL y la subunidad de la RNA polimerasa II Rpb1 cuando está hiperfosforilada esta última. Esta interacción requiere hidroxilación en un dominio similar al ODD de HIF [56]. Además, en *C. elegans* se ha comprobado la inducción de genes por pérdida de VHL incluso en animales HIF^{-/-} [48].

4. SENSORES DE OXÍGENO. HIDROXILASAS DE HIF: EGLNs y FIH

Como se ha indicado anteriormente, tanto la estabilidad como la actividad de HIF- α en función del oxígeno molecular disponible están reguladas por una familia de dioxigenasas dependientes de O₂, Fe²⁺, 2-OG y ascorbato (Figura 5). EGLN1, 2 y 3 en humanos (también conocidos como PHD2, 1 y 3 ó HPH-2, HPH-3 y HPH-1 respectivamente) son las responsables de regular la estabilidad de HIF- α mediante la hidroxilación en residuos conservados de prolina dentro del motivo LXXLAP (dónde X indica cualquier amino ácido) [57, 58] (Figura 3).

Curiosamente, estas enzimas muestran diferente especificidad de sustrato por las distintas prolina de HIF- α . Mientras que EGLN1 y EGLN2 pueden hidroxilar ambas prolina (P402 y P564 en HIF-1 α humano), EGLN3 no reconoce el residuo N-terminal (P402 en HIF-1 α humano) [59-62].

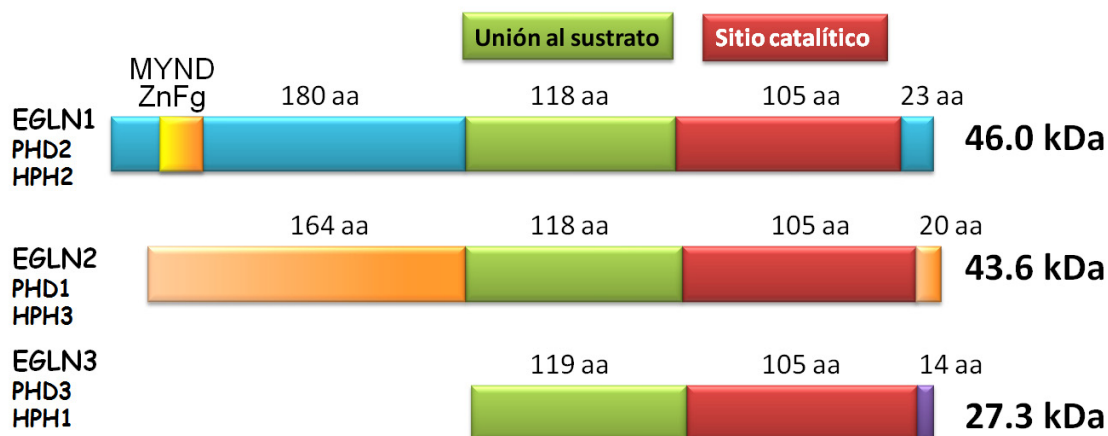


Figura 5. Dominios estructurales de las EGLNs. Las tres isoformas EGLN1, EGLN2 y EGLN3 comparten un dominio catalítico de 105 aa en el extremo carboxilo terminal y un dominio amino terminal de unos 120 aa implicado en el reconocimiento de sustrato. Adicionalmente, tanto EGLN1 como EGLN2 presentan un dominio único amino terminal cuya función no ha sido caracterizada. EGLN1 además presenta un dominio dedo de Zinc tipo MYND en el dominio amino terminal único.

Estudios *in vitro* sugieren que EGLN1 (PHD2) es el regulador principal de HIF- α , pues su inactivación, pero no la de EGLN2 o EGLN3, resulta en la acumulación de HIF- α en presencia de oxígeno [63]. Sin embargo, estos resultados pueden deberse a la elevada expresión relativa de EGLN1 frente a las otras isoformas en las líneas celulares estudiadas. Así, las tres isoformas EGLN juegan un importante papel en la regulación de HIF, el protagonismo de una u otra en cada tejido probablemente dependa de su abundancia relativa en el mismo [61].

Mediante ensayos *in vitro*, se han caracterizado las constantes cinéticas de las EGLNs con distintos péptidos sintéticos de HIF- α . Así, la K_m de las EGLNs por el O_2 se estima en 100 μM [59, 62], valor muy superior a la concentración de O_2 en los tejidos, cuyo rango oscila entre 4 y 40 μM . En esta situación, la concentración de oxígeno estaría lejos de los niveles saturantes para las EGLNs, por lo que pequeñas reducciones en la pO_2 afectarían significativamente a la velocidad de hidroxilación de HIF- α y como consecuencia a su estabilidad [64]. Por esta razón se considera que estas enzimas actúan como efectivos sensores celulares de oxígeno. Además, la velocidad de hidroxilación catalizada por estas enzimas, también estaría condicionada por su concentración en la célula [64].

Al igual que se observa con la pérdida de VHL, estudios en modelos animales de inactivación de las EGLNs ponen de manifiesto una activación constitutiva de HIF [65].

En este sentido, recientes estudios en pacientes con eritrocitosis han revelado dos mutaciones heterocigóticas en el gen de EGLN1 (P317R, R371H) que disminuyen la actividad hidroxilasa y la capacidad de unión a sustrato de estas enzimas [66, 67], lo que conlleva a una estabilización aberrante de HIF-1. Curiosamente estas mutaciones se asocian a policitemia pero no a tumores, poniendo de manifiesto la complejidad del sistema y, posiblemente, que HIF no es suficiente para generar tumores.

4.1. REGULACIÓN DE LAS EGLNs

Las prolil- y asparagin- hidroxilasas de HIF, como enzimas de no equilibrio, sólo catalizan la hidroxilación de su sustrato y no la reacción inversa. Por ello, la abundancia de estas enzimas afecta directamente a la acumulación y actividad de HIF a diferentes pO_2 . La expresión de las distintas isoenzimas EGLN varía entre diferentes tejidos, aunque no se conoce el papel fisiológico de estas diferencias in vivo [68]. EGLN1 se expresa mucho en testículo mientras que el mRNA de EGLN3 es muy abundante en corazón. Se han generado los ratones knock-out para EGLN1-3 y se ha caracterizado el fenotipo de los mismos [65]. Los ratones homocigotos EGLN1^{-/-} no son viables, pero recientes estudios realizados en ratones heterocigotos para EGLN1 [69] han puesto de manifiesto que la deficiencia de esta enzima en condiciones de hipoxia (en tumores implantados en los ratones EGLN1^{+/-}) promueve la remodelación del endotelio con el fin de restablecer el aporte de oxígeno. Además esta normalización tiene como consecuencia una disminución de la invasión celular y metástasis. Los ratones EGLN2^{-/-} muestran protección frente al daño muscular inducido en hipoxia en un modelo murino de isquemia en la pata [70]. En cambio, de los estudios derivados de los ratones EGLN3^{-/-} se deduce un importante papel de esta proteína en la regulación de la integridad anatómica y fisiológica del sistema simpatoadrenal [71].

Uno de los estímulos que induce la expresión de EGLN1 y EGLN3 es la hipoxia en sí misma. Inicialmente se observó que la vida media de HIF- α disminuía significativamente en períodos prolongados de hipoxia [72]. Posteriormente se encontró que el mRNA de EGLN1 y EGLN3, pero no de EGLN2, se inducía por hipoxia [30], y que dicha inducción era dependiente de HIF [73] mediada por HREs funcionales en los genes que codifican para ambas enzimas ([74] y [75] respectivamente). Por lo tanto, la inducción en hipoxia de EGLN1 y EGLN3 conlleva a un bucle negativo que podría estar

implicado en el aumento del rango de regulación por oxígeno en períodos de hipoxia prolongados [76]. En 2006 se identificaron dos nuevos transcritos de EGLN3, denominados PHD3Δ1 y PHD3Δ4 [77]. Se observó expresión de EGLN3 y PHD3Δ1 en todos los tejidos y líneas celulares analizadas, pero la expresión de PHD3Δ4 parecía restringida a tejidos derivados de cáncer primario. PHD3Δ4 conserva actividad prolil-hidroxilasa, aunque no se conoce la importancia de este transcrito en la regulación de HIF por oxígeno.

Se han encontrado evidencias experimentales que sugieren un alto nivel de complejidad en la regulación de las EGLNs. Así, su actividad se inhibe tras quelar el calcio intracelular, a pesar de no haberse identificado ningún sitio de unión a calcio [78], lo que podría indicar el requerimiento de algún cofactor dependiente de calcio para una actividad total. Se ha visto que las E3-ubiquitin ligasas Siah1 a/2 co-inmunoprecipitan con EGLN2 y EGLN3 [79]. Siah1 a/2 parece aumentar especialmente la proteólisis de EGLN3. Las células deficientes en Siah1 a/2 muestran niveles de EGLN3 más elevados y una pérdida de la inducción de HIF-1 α que es revertida silenciando EGLN3 con siRNA. Curiosamente, las proteínas Siah son inducibles por hipoxia, lo que implicaría un aumento en la proteólisis de EGLN3 en hipoxia. Como ya se ha comentado, EGLN3 se induce en hipoxia de forma dependiente de HIF [73]. Así, la hipoxia aumentaría tanto la expresión como la degradación de EGLN3 que en última instancia controlaría la estabilidad de HIF. Se desconoce como afectarían estas regulaciones opuestas a la homeostasis de oxígeno en condiciones fisiológicas, pero se ha observado que los ratones Siah2^{-/-} sometidos a hipoxia muestran una respuesta eritropoyética defectuosa, lo que podría indicar una relevancia fisiológica de esta regulación [79].

En los primeros intentos para purificar una prolil-hidroxilasa de HIF-1, el complejo purificado resultó tener un peso aparente de 320-440 kDa, masa que superaba aquella estimada para las EGLNs aisladas [80], se ponía de manifiesto la existencia de proteínas asociadas a las EGLNs. Una de las proteínas que resultó coprecipitar con EGLN3 fue el complejo de chaperonina TriC, aún falta elucidar si EGLN3 es sustrato de plegamiento para este complejo [81]. La interacción de EGLN1 con OS-9, una proteína ampliamente expresada cuya función no ha sido determinada, parece aumentar la actividad prolil-hidroxilasa de la primera promoviendo así la degradación de HIF-1 α [82]. El silenciamiento de OS-9 con siRNA aumenta los niveles de la proteína HIF-1 α , su actividad transcripcional y la expresión en normoxia de uno de los genes diana de HIF,

VEGF. Por otro lado, se ha estudiado la interacción entre EGLN1 y la proteína supresora de tumores ING4. Esta interacción no parece influir en la estabilidad de HIF ni en la actividad de EGLN1 sino en la actividad transcripcional de HIF-1 α , probablemente mediante reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina [83].

4.2. OTROS SUSTRATOS DE LAS EGLNs

La identificación de sustratos potenciales de las EGLNs supone un área intensa de investigación. En este sentido, recientemente se han descrito nuevas dianas reguladas específicamente por una isoforma concreta. Así, se ha visto que en normoxia, EGLN2 contribuiría a disminuir la actividad NF- κ B mediando la estabilidad de la subunidad beta del complejo IKK a través de un dominio ODD conservado en el mismo [84]. También se ha descubierto que EGLN3 controla la estabilidad de ATF-4, independientemente de pVHL, a través de un dominio ODD en éste último [85]. Por último, el grupo de A. Buchberger ha identificado recientemente una nueva diana de pVHL, la DGKi [86]. Esta isoforma presenta un dominio LXXLAP no conservado en otras isoformas de la misma familia. La interacción pVHL-DGKi es dependiente de actividad prolil hidroxilasa. Esta interacción podría tener gran relevancia funcional ya que DGKi se expresa principalmente en cerebro y retina [87], órganos afectados con frecuencia en el síndrome de Von Hippel Lindau. Además, en este estudio [86] la expresión de EGLN3 favorece más la interacción DGKi/pVHL que EGLN1 o EGLN2. Este resultado estaría en consonancia con la posibilidad de que EGLN3 haya evolucionado para reconocer un rango más amplio de sustratos [88]. En este sentido, recientemente se ha identificado el sitio de unión a sustrato de las EGLNs [89, 90], demostrando múltiples diferencias entre las tres EGLNs.

4.3. MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROXILASA POR IONES Y METABOLITOS

Dado que las EGLNs, además de oxígeno molecular, requieren ión ferroso (Fe^{2+}) como cofactor, el estado redox del hierro unido al centro activo de estas enzimas puede regular su actividad [91]. En este sentido, el aumento de H_2O_2 observado en células $\text{junD}^{-/-}$ conlleva una disminución en la actividad hidroxilasa de las EGLNs y una consecuente acumulación de HIF-1 α [92]. Por otro lado, estudios estructurales han mostrado que el Fe^{2+} del centro activo puede sustituirse por metales como Co^{2+} , Cu^{2+} ,

Zn^{2+} y Mn^{2+} incapaces de permitir el ciclo catalítico de estas enzimas. Lo cual explica la inducción de HIF- α por metales pesados y podría tener relevancia para comprender las patologías asociadas a la exposición a estos metales [93-95].

Finalmente, los metabolitos intermedios del ciclo de Krebs modulan directamente la actividad de las EGLNS y FIH [96]. El 2-Oxoglutarato (α -cetoglutarato), un producto del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y del catabolismo de los aminoácidos, es un cosustrato de las EGLNs y FIH (Figura 6). Además, la descarboxilación oxidativa del 2-OG por las dioxigenasas EGLNs y FIH está acoplada a la formación de succinato, un inhibidor competitivo de la actividad hidroxilasa que puede revertirse con un exceso de 2-OG [97]. Mutaciones en las enzimas mitocondriales del ciclo de Krebs SDH (succinato deshidrogenasa) y FH (fumarato hidratasa) pueden promover tumorigénesis [98]. SDH y FH son supresores tumorales, directamente ligados con la cadena respiratoria. El mecanismo causante de la tumorigénesis podría explicarse por la acumulación de succinato o fumarato; que provocarían la inhibición competitiva de las EGLNs. Se crearía así una situación “pseudohipóxica” [99] donde HIF induciría sus genes diana tales como VEGF, promoviendo la formación de tumores altamente vascularizados [98]. La utilización de estos intermedios metabólicos apoya una potencial interconexión entre las hidroxilasas de HIF y el metabolismo energético.

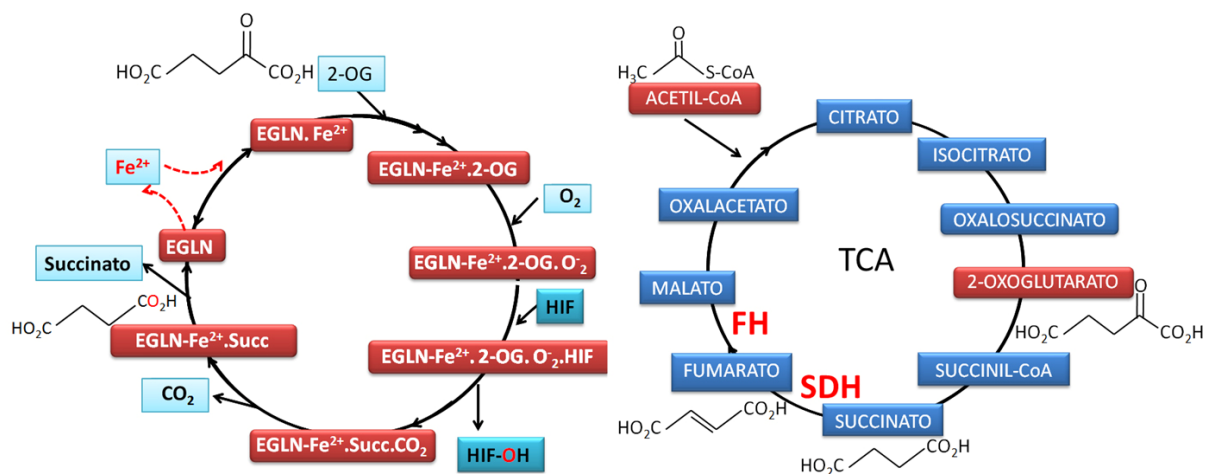


Figura 6. Conexión entre la reacción catalizada por las EGLNs y el ciclo de Krebs. El 2-oxoglutarato (2-OG), descarboxilado estequiométricamente durante la hidroxilación de HIF en presencia de dioxígeno y hierro, es un intermediario del ciclo de Krebs. En la reacción de hidroxilación de HIF se liberan como subproductos CO₂ y succinato, siendo éste último nuevamente un intermediario del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Tanto el succinato como el fumarato son inhibidores competitivos de la actividad hidroxilasa de las EGLNs, inhibición que puede revertirse con un exceso de 2-OG.

5. REGULACIÓN DE HIF INDEPENDIENTE DE OXÍGENO

Diferentes estudios han mostrado cómo HIF-1 puede activarse por diversos mecanismos independientes de la hipoxia tales como la activación de oncogenes [100], la inactivación de genes supresores de tumores [29, 101, 102] y la activación de vías de señalización promovidas por factores de crecimiento [103-105]. Excepto en el caso de la inactivación de VHL, los mecanismos por los que estas rutas de señalización desembocan en la activación de HIF no están completamente claras, pero parece que podrían aumentar la tasa de traducción de HIF- α a través de la activación de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) provocando su acumulación por saturación de la maquinaria de degradación. Ya que HIF-1 transactiva genes que codifican para factores de crecimiento, como IGF-II y TGF- α , y éstos activan la señalización mediada por PI3K/Akt y MAPK, se establece un bucle en el que HIF-1 puede activarse de forma autocrina [106].

No obstante, la acumulación de HIF observada ante la estimulación por diversos factores solubles en normoxia parece independiente de la ruta canónica de degradación de HIF- α por oxígeno [107, 108].

6. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA RUTA DE HIF

La importancia de la ruta EGLN-HIF-VHL se pone de manifiesto en las numerosas patologías, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamación y anemias, que cursan con hipoxia [8, 109-112]. Los episodios de isquemia, en el contexto cardiovascular, tienen como consecuencia una drástica reducción en el aporte de oxígeno y nutrientes a los tejidos afectados por la lesión. Por otro lado, las células transformadas en proliferación van formando una masa tumoral cuyo volumen no permite la correcta oxigenación por simple difusión, se genera entonces una situación de hipoxia tumoral. Esta situación estimula la inducción de un programa adaptativo que conlleva la formación de nuevos vasos y el cambio a metabolismo anaerobio, que favorecería la progresión tumoral [113, 114].

Debido al número y relevancia de patologías que cursan con hipoxia, HIF y las proteínas implicadas en su regulación se presentan como potenciales dianas terapéuticas. Así, la inhibición de HIF podría interferir con la progresión tumoral [115] mientras que la activación artificial del mismo podría interesar para la inducción de angiogénesis en

pacientes diabéticos o la protección de miocardio y cerebro en infartos y accidentes cerebrovasculares respectivamente [116, 117]. Así, se han descrito moléculas capaces de disminuir la actividad transcripcional de HIF impidiendo su unión a p300 [118], fármacos que impiden su estabilización por hipoxia [119] y moléculas que interfieren con su actividad transcripcional de forma inespecífica [120, 121]. Por otro lado, se han descrito varios inhibidores de las EGLNs, que bien ofrecen protección frente a isquemia [111, 122] o inducen angiogénesis in vivo [123]. De hecho, algunas compañías farmacéuticas han desarrollado pequeñas moléculas inhibitoras de las EGLNs basadas en la competición con la unión de los cofactores naturales de estos enzimas. Una de estas moléculas desarrollada por Fibrogen, el FG-4539, ha mostrado tener un papel neuroprotector en modelos preclínicos de daño isquémico. Otro inhibidor, el FG-2216, fue el primero en conseguir una respuesta eritropoyética eficiente en humanos (via inducción del gen diana de HIF, eritropoyetina) y se ha probado en ensayos clínicos como agente terapéutico en anemia de la enfermedad crónica de riñón [124]. Recientemente, se ha visto la capacidad de dos pequeñas moléculas, TM6008 y TM6089, de inhibir la actividad hidroxilasa mediante un mecanismo que implica la unión al centro activo del enzima [125].

No obstante, la mayoría de los inhibidores empleados hasta la fecha son altamente tóxicos y/o inespecíficos. Tal es el caso de los quelantes de hierro como la deferroxamina, o metales que compiten con el hierro del centro activo como el cobalto. Los análogos del 2-oxoglutarato y compuestos relacionados presentan mayor especificidad al ser capaces de unirse al centro activo de las EGLNs impidiendo que completen el ciclo enzimático [126]. Sin embargo, su especificidad es incompleta, dado el alto grado de similitud entre el sitio catalítico de distintas hidroxilasas. De hecho, muchos de estos compuestos se desarrollaron como inhibidores de las prolil-hidroxilasas de colágeno con el fin de reducir la fibrosis tisular [127]. Estudios recientes en los que se identifican regiones específicas, alejadas del centro catalítico, responsables de conferir especificidad de sustrato a cada isoforma EGLN [89, 90], abren la posibilidad de diseñar inhibidores específicos para cada isoforma en base a los diferentes sitios de unión al sustrato. De hecho, la búsqueda de este tipo de inhibidores es un área de creciente interés. Así, ensayos que permitan el rastreo masivo de drogas que afecten de forma específica a la actividad EGLN o la unión a su sustrato, permitirán identificar nuevos moduladores de la reacción catalizada por estos

enzimas. En los siguientes párrafos se describen los ensayos actualmente utilizados para determinar la actividad hidroxilasa de estos enzimas.

6.1. ENSAYOS DE ACTIVIDAD EGLN, PROLIL-HIDROXILASA DE HIF

Hasta la fecha, se han descrito varios ensayos que permiten determinar la actividad EGLN. Entre estos ensayos se encuentran los que determinan el cociente O_2 y 2-OG consumido/ CO_2 generado y aquellos que detectan hidroxilación de HIF mediante espectrometría de masas o captura de VHL [128, 129]. Por su formato, estos ensayos no son fácilmente escalables a los requerimientos de la búsqueda masiva de fármacos. Además presentan inconvenientes como el uso de radioactividad (en la medida de CO_2 liberado en la decarboxilación de 2-oxo-[1- ^{14}C]-glutarato o en la detección de [^{35}S]pVHL en los ensayos de captura de VHL). Por último, otra limitación de estos ensayos *in vitro* es la ausencia del entorno fisiológico. Por esta razón, se han desarrollado distintas estrategias para determinar la actividad EGLN en células, tales como la detección de proteínas reporteras fusionadas al ODD de HIF [130] y el empleo de anticuerpos que reconocen las hidroxiprolinas en los dominios ODD [100]. Sin embargo, estos ensayos son cualitativos y no escalables en la práctica. Además, los ensayos basados en células se enfrentan a la posible interferencia de la maquinaria de HIF endógena.

En este escenario, la técnica de doble híbrido en levaduras [131] emerge como una metodología apropiada para la búsqueda de pequeñas moléculas moduladoras de la actividad hidroxilasa, así como para el estudio de la bioquímica de la interacción HIF-VHL y HIF-EGLN [60]. Esta técnica, que ya se ha empleado para el rastreo de pequeñas moléculas que inhiban la interacción entre proteínas [132, 133] ofrece la posibilidad de reconstituir la regulación de HIF en mamíferos en un entorno celular libre de interferencias con las proteínas endógenas; ya que, hasta la fecha, no se han encontrado ortólogos de estas proteínas en levaduras. La reconstrucción de la maquinaria de HIF en dicho entorno permitiría desarrollar ensayos relativamente sencillos y económicos que permitieran identificar moléculas capaces de interferir con la interacción entre los distintos elementos de la ruta.

Objetivos

Debido a la importancia de la ruta canónica de HIF en diversas patologías, nos propusimos como principales objetivos:

1. Generar un sistema basado en la técnica de doble híbrido en levaduras que reproduzca la regulación de HIF que tiene lugar en mamíferos: Hidroxilación de HIF por EGLN y reconocimiento de HIF hidroxilado por parte de VHL.
2. Mediante el empleo del sistema generado, profundizar en el estudio de la bioquímica en las interacciones del sistema EGLN-HIF-VHL.
3. Optimizar el sistema para su uso como herramienta en la búsqueda de moduladores de la ruta de HIF, incorporando un sistema paralelo de controles de especificidad.
4. Validar el sistema triple híbrido junto con su sistema control como herramienta apta para la búsqueda de nuevas moléculas moduladoras de la actividad EGLN o de la interacción HIF-EGLNs y/o VHL-HIF hidroxilado.

Materiales y Métodos

1. REACTIVOS Y MEDIOS

1.1. Medios de cultivo de levaduras

YPD (*yeast extract/peptone/dextrose*): Sigma cat# 8601-1

Medio SD (*synthetic defined*): Sigma cat# 630412

Adenina: Sigma cat# A-9126

Medio suplementario -Leu-Trp (DO supp, Clontech cat# 630417)

Medio suplementario -Leu-Trp-His-Ade (DO supp, Clontech cat# 630417)

1.2. Drogas empleadas en este estudio

- 15d-PGJ₂ (*15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂*). Cayman Chemical, Cat. No. 18570.
- Cloruro de Cobalto (CoCl₂·6H₂O). SIGMA. Cat. No. 31277
- DEFERROXAMINA (*Desferrioxamine mesylate salt*, DFOM, C₂₅H₄₈N₆O₈·CH₄O₃S). SIGMA. Cat No. D9533
- DMOG (C₆H₉NO₅). Frontier Scientific. Cat No. D1070
- R59949 (*Diacylglycerol Kinase Inhibitor II*). Calbiochem. Cat No. 266788
- S956711 fue cedido por SANOFI-AVENTIS.

2. CULTIVOS CELULARES

La línea celular HeLa, empleada para la obtención de cDNA humano, se cultivó en placas de 100 mm de diámetro con DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado con 10% FCS y antibióticos (50 µg de penicilina/estreptomicina por ml) a 37 °C en una atmósfera humedecida al 5% CO₂.

La cepa bacteriana *XL-2 Blue* derivada de *Escherichia coli* fue empleada para la transformación y propagación de los plásmidos de clonaje. Se creció en medio LB líquido (extracto de levadura al 0,5% (p/v), bacto triptona al 1% (p/v) y NaCl al 1% (p/v)) en un incubador a 37°C y en agitación a 200 rpm. El medio sólido LB-agar se obtuvo añadiendo agar al medio LB líquido hasta una concentración final del 1,5% (p/v). Las bacterias en medio sólido se crecieron en un incubador humidificado a 37 °C.

La cepa de levadura derivada de *S. cerevisiae*, AH109, y los plásmidos pBridge y pGADT7 se adquirieron de BD Biosciences (Palo Alto, CA). Para los experimentos de transformación de las levaduras, selección de transformantes y posterior crecimiento en medios condicionados, éstas se crecieron en un incubador humidificado a 30 °C. Para las cinéticas de crecimiento y los ensayos de inhibidores, las levaduras se crecieron en el

medio líquido correspondiente a una temperatura de 30° C y una agitación de 250 rpm.

3. DESCRIPCIÓN DE LA CEPA AH109 Y EL SISTEMA DOBLE Y TRIPLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

La cepa de levadura AH109 es auxótrofa para Leucina, Triptófano, Adenina e Histidina (Tabla I). Esta cepa permite detectar interacciones entre dos proteínas de interés (“X” e “Y”) en ensayos de doble híbrido. Como se esquematiza en la figura 7A, el plásmido pBridge codifica tanto para una de las proteínas de interés fusionada al dominio de unión a DNA de GAL4 (GAL4 BD-“X”) como para la enzima implicada en rescatar la auxotrofia para Trp (TRP1). El plásmido pGADT7, en cambio, codifica para la otra proteína de interés fusionada al dominio de activación de GAL4 (GAL4-AD-“Y”), así como para LEU2 (implicado en rescatar la auxotrofia para Leu). Así, los transformantes pueden seleccionarse en medio SD -L-W (denominado medio Control, que carece de estos dos aminoácidos). Por otro lado, los genes reporteros ADE2, HIS3 (cuyos productos rescatan la auxotrofia de Adenina (A) e Histidina (H) respectivamente) y lacZ están integrados en el genoma de la levadura, bajo el control de elementos de respuesta a GAL4. Por lo tanto, sólo cuando tiene lugar la interacción entre las proteínas de fusión GAL4-BD-“X” y GAL4-AD-“Y”, se reconstituye el factor de transcripción GAL4 funcional, el cual dirige la expresión de los genes reporteros (Figura 7B). De este modo, se puede monitorizar la interacción de las proteínas de fusión mediante el crecimiento de las levaduras en medios Restrictivos SD -L-W-H o SD -L-W-H-A (media y alta astringencia respectivamente).

TABLA I

GENOTIPO de la CEPA AH109 ^a	GENES REPORTEROS ^b	MARCADORES DE TRANSFORMACIÓN ^c	REF.
<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4_A</i> , <i>gal80_A</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	<i>HIS3</i> , <i>ADE2</i> , <i>lacZ</i> , <i>MEL1</i>	<i>Trp1</i> , <i>leu2</i>	CLONTECH Yeast Protocols Handbook

^a Las mutaciones *trp1*, *his3*, *gal4* y *gal80* son deleciones, *leu2-3*, *112* es una mutación doble. Las secuencias consenso UAS y TATA, confieren sitios de unión al GAL4 DNA-BD (Codificado por el vector de expresión pBRIDGE)

^b *lacZ* codifica para β-galactosidasa y confiere un fenotipo azul a las colonias positivas. *HIS3*, *LEU2* y *ADE2* confieren prototrofia para His, Leu y Ade respectivamente. Por tanto los fenotipos positivos His⁺, LEU⁺ y Ade⁺, obtenidos cuando interaccionan las proteínas de fusión, permiten el crecimiento de la cepa AH109

^c Genes usados como marcadores de selección en este sistema, codificados por los vectores de expresión pBRIDGE y pGADT7.

El sistema triple híbrido en levaduras consiste en una modificación del doble híbrido, mediante la introducción en el mismo de un tercer elemento (Figura 7C). En nuestro estudio, el tercer elemento es una enzima que añade una modificación post-traduccional en una de las proteínas de fusión. Dicha modificación post-traduccional es necesaria para que tenga lugar la interacción entre las dos proteínas de fusión a GAL4.

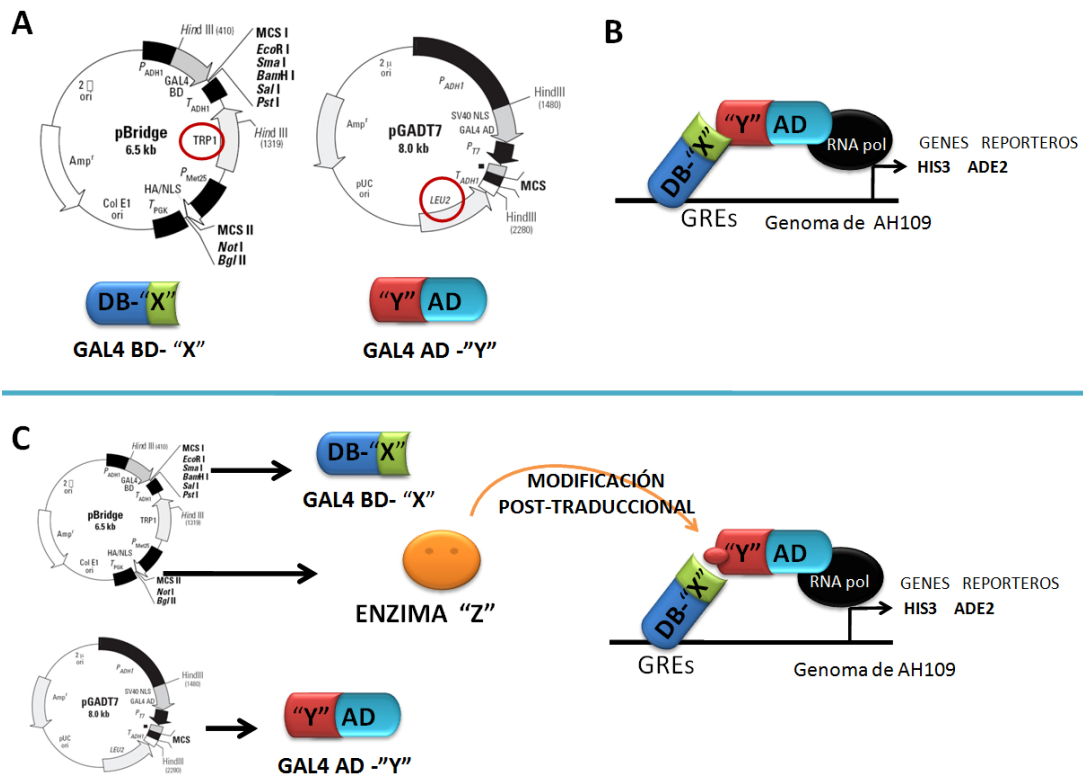


Figura 7. Esquema general de los sistemas doble y triple híbrido en levaduras. A) Los vectores de expresión pBridge y pGADT7 codifican para las proteínas de interés fusionadas al dominio de unión a DNA (GAL4 BD-"X") o al dominio de activación (GAL4 AD-"Y") respectivamente. Además pBridge y pGADT7 codifican para TRP1 y LEU2 respectivamente, cuyos productos rescatan la auxotrofia de la levadura para Triptófano y Leucina. Así, las levaduras transformadas con ambos plásmidos se seleccionan en medio condicionado SD -L-W (medio Control, mínima astringencia). B) La interacción entre las proteínas de fusión reconstituye el factor de transcripción GAL4 funcional, el cual dirige la expresión de los genes reporteros ADE2 e HIS3 (implicados en la síntesis de histidina y adenina respectivamente), permitiendo el crecimiento de las levaduras en medio Restrictivo de media y alta astringencia (SD -L-W-H y SD -L-W-H-A respectivamente). C) Sistema triple híbrido. El vector pBridge posee un segundo sitio de policlonaje que permite expresar una proteína adicional respecto al sistema doble híbrido. En el sistema triple híbrido, la actividad enzimática de la proteína "Z" es necesaria para que tenga lugar la interacción entre las dos proteínas de fusión. GREs: Elementos de Respuesta a Gal4. L: Leucina, W: Triptófano, H: Histidina, A: Adenina.

4. CLONAJES

4.1. Obtención de cDNA humano

Extracción de RNA. Se extrajo RNA total de células HeLa incubadas en DMEM 10% FBS mediante el método de extracción fenólica con el reactivo ULTRASPEC

siguiendo las indicaciones del proveedor.

Retrotranscripción. A 1 μL de RNA (a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se añadió 1 μL de *Random Primer* (Promega) y H_2O mili Q autoclavada hasta un volumen final de 10,5 μL . La mezcla se incubó durante 5 minutos a 70°C y a continuación a 4 °C durante 1 minuto para hibridar los oligonucleótidos al RNA. A continuación se añadió 9,5 μL del cóctel de síntesis de cDNA (Promega) [4 μL tampón RT 5x, 2.5 μL de MgCl_2 , 1 μL de una mezcla de dNTPs (10 mM), 0,5 μL de inhibidor de RNAsas (RNAsin, promega), 50 U de *Expand Reverse Transcriptase* (1 μL) y H_2O mili Q autoclavada]. Los tubos se agitaron vigorosamente y se incubaron durante 1 hora a 42 °C. Para detener la reacción se calentaron las muestras 15 minutos a 75 °C y a continuación se enfriaron rápidamente en hielo. Los cDNAs se conservaron a -20 °C.

4.2. Generación de las construcciones plasmídicas

Los clonajes se realizaron siguiendo las indicaciones del manual de laboratorio *Molecular Cloning* (Sambrook & Russell). Así, las construcciones que expresan HIF-1 α (residuos 392-414), HIF-1 α (554-576) y hSYK (11-263) como proteína de fusión a Gal4AD se generaron por amplificación mediante PCR (tabla II) de la región codificante indicada a partir de cDNA humano y clonaje en los sitios EcoRI/BamHI o EcoRI del plásmido pGADT7 respectivamente. Las construcciones que expresan proteínas fusionadas a Gal4BD se obtuvieron por amplificación por PCR (tabla II) de las secuencias codificantes indicadas a partir de la secuencia completa clonada (VHL) o a partir de cDNA humano (FceRI γ). Los amplicones de VHL (residuos 63-157) y FceRI γ (residuos 45-86) se clonaron en los sitios EcoRI/BamHI o EcoRI del MCS I del pBridge respectivamente. Por último, las secuencias codificantes para EGLN3, EGLN1 y LCK se amplificaron por PCR (tabla II). Las secuencias de EGLN1 y EGLN3 se clonaron en el sitio BglII o en los sitios Hind III y EcoRI de la construcción pBridge-VHL (63-157) respectivamente. La secuencia codificante para LCK se clonó en el sitio NotI/BglII de pBridge-FceRI γ (45-86). LCK se amplificó a partir de cDNA humano mientras que EGLN1 y EGLN3 se obtuvieron a partir de su cDNA clonado, cedido generosamente por Steven L. McKnight. Para los ensayos de doble híbrido, las construcciones que expresan EGLN3 fusionada a Gal4BD se obtuvieron clonando su secuencia codificante en los sitios XmaI/SalI del plásmido pBridge [60].

Tabla II: Oligonucleótidos empleados para la generación de las construcciones usadas en este estudio.

GEN	OLIGONUCLEÓTIDOS	SITIOS DE RESTRICCIÓN
HIF1 (392-414)	D 5' AGCTGAATTCATGGCAATGGAACCTGATGCTTAACTTTGCTG 3'	EcoRI
	I 5' AGCTCTCGAGGGATCCTCAGCCAAAATCTAAAGATATGATTGTG 3'	BamHI
HIF1 (554-576)	D 5' GAATTCATGGCAATGACAGATTTAGACTTGGAGATG 3'	EcoRI
	I 5' GGATCCTCAGGAACGTAAGTGAAGTCATC 3'	BamHI
SYK	D 5' GAATCAACCACCTGCCCTTCTT 3'	EcoRI
	I 5' GAATCTGCCGATTTTTGACATGG 3'	EcoRI
VHL	D 5' AGCTGAATTCCTGCGCTCGGTGAACCTCGCGC 3'	EcoRI
	I 5' AGCTCTCGAGGGATCCTCAAGTATACTGGCAGTGTGATATTG 3'	BamHI
FceRI γ	D 5' GAATTCGACTGAAGATCCAAGTGC GAAAG 3'	EcoRI
	I 5' GAATTCCTACTGTGGTGGTTCTCATGCTTCAG 3'	EcoRI
LCK	D 5' TGATCAGCGGCCGCCATGGGCTGTGGCTGCAGCTCACAC 3'	BclI
	I 5' GCGGCCGCTGATCATCAAGGCTGAGGCTGGTACTGGCC 3'	NotI
EGLN3	D 5' AGCTAAGCTTACCATGAGATCTTCTAGAATGCCCTGGGACACATCATGAGG 3'	Hind III
	I 5' GACTGAATTCCTGATCAGTCGACGTCTCAGTGAGGGCAGATTCAG 3'	EcoRI
EGLN1	D 5' GCGGCCGAGATCTTCTAGAATGGCCAATGACAGCGGGGGCC 3'	BglII
	I 5' GCGGCCGCTCAAGATCTGAAGACGTCTTTACCGACCGAATC 3'	BglII

D: Sentido directo (Hibrida con la hebra 5'-3' del DNA).

I: Sentido inverso (Hibrida con la hebra 3'-5' del DNA).

En todos los casos los amplicones fueron clonados en pCR2.1 como paso intermedio. A partir de estas construcciones se determinó la integridad de las secuencias mediante secuenciación y posterior análisis comparativo con la herramienta “*Align two sequences (bl2seq)*” que puede encontrarse en la siguiente dirección del NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. El procedimiento consiste en alinear la secuencia analizada con la secuencia teórica (siempre se escogían secuencias depuradas refseq) del gen en cuestión. Una vez comprobada la fidelidad de la secuencia se procedió al subclonaje de los insertos en los vectores de expresión definitivos pBridge y pGADT7 (construcciones resumidas en la tabla III).

Tabla III: Construcciones empleadas en este estudio.

EXPRESIÓN A PARTIR DEL PROMOTOR ADHI					EXPRESIÓN BAJO PMET25	
NOMBRE	VECTOR	PROTEÍNA	FRAGMENTO	MUTACIONES	PROTEÍNA	FRAGMENTO
AD-P564	pGADT7	GAL4 AD- HIF	554-576	wt		
AD-P564Amut	pGADT7	GAL4 AD- HIF	554-576	P564A		
AD-L574A	pGADT7	GAL4 AD- HIF	554-576	L574A		
AD-L562R	pGADT7	GAL4 AD- HIF	554-576	L562R		
AD-P402	pGADT7	GAL4 AD- HIF	392-414	wt		
AD-SH2	pGADT7	GAL4 AD- SYK SH2	11-236	wt		
BD-VHL	pBridge	GAL4 BD- VHL	63-157	wt		
E3/BD-VHL	pBridge	GAL4 BD- VHL	63-157	wt	EGLN3	COMPLETO
E1/BD-VHL	pBridge	GAL4 BD- VHL	63-157	wt	EGLN1	COMPLETO
BD-ITAM	pBridge	GAL4 BD- ITAM	45-86	wt		
LCK/BD-ITAM	pBridge	GAL4 BD- ITAM	45-86	wt	LCK	COMPLETO
BD-E3	pBridge	GAL4 BD- EGLN3	COMPLETO	wt		

Generación de las construcciones mutadas:

Las construcciones mutadas AD-P564Amut (Figuras 11, 13 y 14), AD-L574A y AD-L562R (Figura 14) se generaron por PCR utilizando como molde la construcción pGAD-HIF-1 α (554-576) y oligonucleótidos en los que el codon para la posición mutada se sustituía por la secuencia al azar NNS [60]. La identidad de todas las construcciones se confirmó mediante secuenciación.

5. WESTERN BLOTS

Para la realización de los western se siguió el protocolo especificado por el proveedor, obteniendo los extractos proteicos por el método urea/SDS (*Yeast Protocols Handbook*, Clontech. <http://www.clontech.com>). A continuación se muestra una breve descripción del método utilizado.

Preparación de los extractos proteicos

Las levaduras transformadas y crecidas en medio control (SD -L-W) se sedimentan por centrifugación a 1000 x g durante 5 min a 4 °C. Los sedimentos se lavan con agua destilada a 0° C volviendo a centrifugar durante 5 min a 1000 x g para obtener

de nuevo un sedimento. Se introduce el tubo de centrifuga en nitrógeno líquido. Las células se almacenan a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se descongelan las células del paso anterior mediante resuspensión en 1 mL buffer de lisis precalentado (con Urea, SDS, PMSF, inhibidor de proteasas y β -mercapto-etanol). Se transfiere cada suspensión celular a un tubo de 1,5 mL con esferas de vidrio de 0,5 mm (Sigma Cat No. G-8772). Se calientan las muestras a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min y a continuación se agitan vigorosamente en un vortex durante 1 minuto. A continuación se centrifugan a 14.000 rpm durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se incuba en hielo (primer sobrenadante). Los sedimentos se calientan durante 5 min a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se agitan vigorosamente en vortex durante 1 minuto. Se vuelve a centrifugar a 14.000 rpm durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se combina el sobrenadante obtenido con el primer sobrenadante y se hierva la mezcla brevemente. Las muestras se cargaron en un gel desnaturalizante de acrilamida 7.5 % y las proteínas de fusión fueron detectadas utilizando los siguientes anticuerpos:

- GAL4 AD Monoclonal Antibody, CLONTECH cat# 630402. Se utilizó a una concentración final de $0.4\text{ }\mu\text{g/mL}$
- GAL4 DNA-BD Monoclonal Antibody, CLONTECH cat# 630403. Se utilizó a una concentración final de $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$

6. ENSAYOS DE TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN IN VITRO Y UNIÓN A GST-HIF

• Transcripción y traducción in vitro

Las EGLNs marcadas con [^{35}S]-met se sintetizaron mediante transcripción/traducción in vitro (IVTT) utilizando el kit TNT T7 junto con lisado de reticulocito de conejo de Promega (cat# L4960). Los plásmidos que codificaban para cada EGLN en pcDNA3 fueron cedidos por Steven L. McKnight.

• Construcciones plasmídicas y purificación de la proteína recombinante GST-HIF

La secuencia correspondiente a los aminoácidos 554-576 de HIF-1 α fue amplificada por PCR con los oligonucleótidos directo 5'-AGCTGAATTCATGGC-AATGACAGATTTAGACTTGGAGATG-3' e inverso 5'-AGCTCTCGAGGGATCCTCAGGAACGT-AACTGGAAGTCATC-3' utilizando cDNA humano como molde y se clonó en los sitios EcoRI/BamHI del vector pGEX4-T1 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden).

La construcción pGEX-HIF1 α (554-576) fue transformada en bacterias de la cepa *BL21* y la expresión de la proteína recombinante fue inducida con IPTG 0.1 mM. La proteína se purificó por cromatografía de afinidad utilizando GSH sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden). La secuencia aminoacídica codificada por esta construcción es: GST-MAMTDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRS.

- **Ensayos de “pull down” GST-HIF/EGLN**

Se incubaron 10 μ L de enzima marcada con [³⁵S]-met con 10 μ g de GST o GST-HIF durante 1 hora a 30 °C en buffer de unión hasta un volumen final de 50 μ L (Hepes 20 mM pH7.6, KCl 5mM, MgCl₂ 1.5 mM, β -mercaptoetanol 1mM, DTT 1mM, PMSF 1mM, FeCl₂ 260 μ M, 2-oxoglutarato 5mM, ácido ascórbico 0.6 mM), a continuación se añadió 20 μ L de bolas de glutation-sefarosa y se incubó toda la mezcla a 30°C durante 1 hora. Posteriormente se lavaron los complejos dos veces con buffer de unión. Las proteínas se eluyeron en Laemmli y se analizaron por SDS-PAGE seguido de autorradiografía.

7. ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS

7.1. Transformación de levaduras por el método de acetato de litio

Este método de transformación está basado en el descrito por Gietz y colaboradores [134]. Para ello se parte de levaduras frescas crecidas en YPD. En primer lugar se crece un inóculo de levaduras en 50 mL de YPD líquido durante unas 12 horas, hasta llegar a saturación (D.O._{.600nm} >1). A continuación se traslada dicho cultivo a un volumen de 300 mL de YPD y se crece a 30 °C y en agitación a 200 rpm hasta llegar a una D.O. de 0.4-0.5 unidades de absorbancia a 600 nm. A esta absorbancia las levaduras se encuentran en la fase de crecimiento exponencial. Seguidamente, se centrifugan a 1000g durante 5 minutos a 20 °C y se resuspende el sedimento en 50 mL de agua miliQ autoclavada por cada 150 mL de cultivo inicial. Se centrifuga nuevamente a 1000g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante. El sedimento se resuspende en 1.5 mL de solución TE/LiAc (10% v/v TE, 10% v/v LiAc y 80% v/v H₂O mQ autoclavada) recién preparada y estéril. Tras este tratamiento las levaduras son competentes para la transformación con las construcciones de interés. A continuación se prepara la mezcla de DNA con 50 ng de DNA *carrier* comercial (de espermatozoos de salmón), 300 ng de la construcción de interés derivada de pBridge y 150 ng de la construcción de interés

derivada de pGADT7 (tabla III). Se mezclan suavemente 100 μ L de levaduras competentes con cada mezcla de DNA. Seguidamente, se añaden 600 μ L de solución PEG/LiAc (10% v/v LiAc, 10% v/v TE y 80% v/v PEG 50%) por tubo y se agita vigorosamente durante 30 segundos. Se incuba la mezcla a durante 30 minutos a 30 °C y 200 rpm. A continuación, se da un choque térmico a 42 °C durante 15 minutos y se enfría en hielo durante 2 minutos. Tras este paso, se centrifuga durante 5 segundos a 13000 rpm. Se descarta el sobrenadante aspirándolo con la pipeta y el sedimento se resuspende en unos 150 μ L de TE ó solución salina (0.9% NaCl). Finalmente se plaquea todo el volumen en placas con medio SD -L-W sólido. Para repartir las levaduras homogéneamente se añaden 10-12 bolas de vidrio autoclavadas de 0.5 mm de diámetro por placa y se agita con cuidado. A continuación se retiran las bolas de vidrio y se incuban las placas a 30 °C durante 48-72 horas.

7.2. Ensayos control de interacción en medio sólido

Se transformaron las distintas construcciones mediante el protocolo descrito anteriormente. Seguidamente, se transfirieron 3-4 clones frescos de las placas SD -L-W de cada transformación a 1 mL de una solución salina (0.9% NaCl) y se prepararon diluciones seriadas de esta suspensión (diluciones 1, $1/2$, $1/4$ y $1/8$). Alícuotas de 8 μ L de cada suspensión se plaquearon en placas de distintas astringencias: 1) placas control que carecen de leucina y triptófano (astringencia mínima; no se requiere interacción entre las proteínas de fusión para que crezcan las levaduras); 2) placas restrictivas que carecen de leucina, triptófano e histidina (astringencia media; se requiere interacción para permitir el crecimiento de las levaduras) y 3) placas restrictivas que carecen de leucina, triptófano, histidina y adenina (astringencia máxima; se requiere una interacción fuerte para permitir el crecimiento de las levaduras). Se incuban las placas a 30 °C durante 24-48 horas. Las imágenes fueron tomadas con un analizador digital de imagen (FUJIFILMLAS-1000 CH).

7.3. PCRs control de las levaduras transformadas

Además de los ensayos control de interacción en medio sólido recién descritos, realizábamos el seguimiento de las levaduras transformadas mediante PCRs utilizando una combinación de los oligos empleados en el clonaje las construcciones (Tabla II) y los oligonucleotidos que hibridan en los plásmidos pGADT7 y pBridge (Figura 8). Para testar

por PCR EGLN3 y LCK (clonadas en el MCS II de pBridge) se utilizaron los mismos oligos directo e inverso utilizados para el clonaje (tabla II). En la Figura 8 se muestran las fotografías de los geles de DNA correspondientes a las PCRs de los distintos transformantes. La flecha a la izquierda indica la proteína codificada por cada secuencia amplificada. En la parte superior de cada pocillo se indica el nombre de las construcciones con las que se ha transformado cada clon. Para la PCR del control positivo (Control +) se utilizó como molde el DNA plasmídico de la construcción correspondiente.

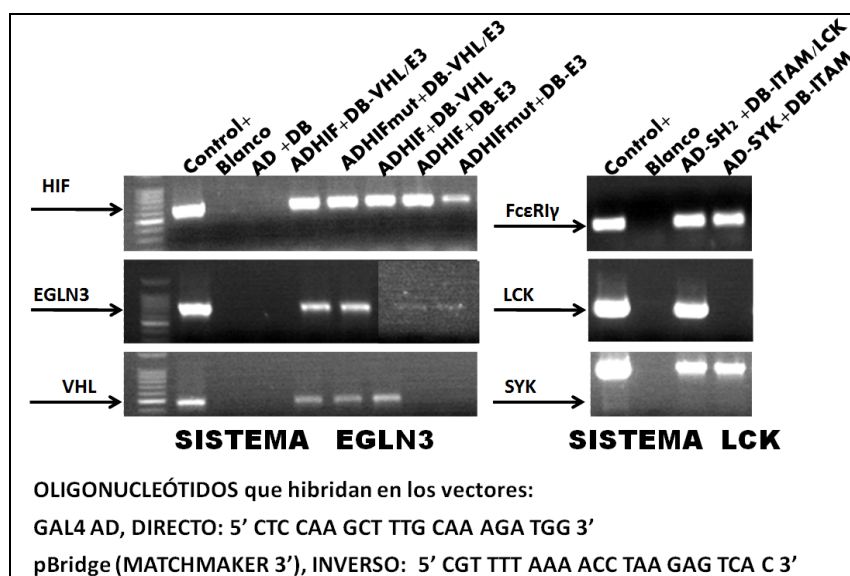


Figura 8. PCRs control de los clones transformados. Los clones frescos de cada transformación se testaban por PCR para comprobar de modo alternativo la correcta transformación de los plásmidos pBridge y pGADT7 codificantes para las distintas construcciones. Se muestran las amplificaciones por PCR de las secuencias codificantes para las proteínas de fusión de cada transformante. A la izquierda sobre las flechas se indica la secuencia amplificada en cada caso. Arriba se indican las construcciones con las que está transformado cada clon. Se aislaba una colonia y se disolvía en 100 μ L de salino, de esta mezcla se utilizaban 2 μ L como molde para cada reacción de PCR. En el caso del control positivo (control +) se utilizó como molde el DNA plasmídico de la construcción correspondiente.

8. ENSAYOS DE CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO

8.1. Cinéticas de crecimiento en medio líquido (Figura 9)

Para realizar estos ensayos se partía de clones de levaduras transformadas en las últimas dos semanas y crecidos en placas control en ausencia de Leu/Trp (-L-W). Para los ensayos de crecimiento en medio líquido, se transferían de cuatro a ocho colonias a 6-8

mL de medio líquido -L-W, este preinóculo se crecía durante 14-22 h a 30 °C y 250 rpm hasta una $D.O._{600nm} \approx 1$ unidad. A continuación se centrifugaban las levaduras a 5000 rpm durante 5 minutos y se resuspendían en medio líquido de alta astringencia (sin Leu/Trp/His/Ade, -L-W-H-A), se volvían a centrifugar en las mismas condiciones y se resuspendían a la densidad óptica previamente determinada para cada transformante (tabla IV) en el medio correspondiente en un volumen final de 1 mL en tubos estériles de 10 mL de capacidad. Los cultivos se crecían a 250 rpm y 30 °C durante los tiempos indicados. El crecimiento de las levaduras se determinó midiendo la absorbancia de los cultivos a 620nm. Para ello se transfería una alícuota del cultivo (150 μ L) a placas multipocillo P96 a diferentes tiempos (Figura 9).

TABLA IV

CLON	PROTEÍNAS DE FUSIÓN		PROTEÍNA ADICIONAL	DILUCIÓN RESPECTO AL PREINÓCULO DE PARTIDA		
	pBridge	pGADT7		CONTROL	RESTRICTIVO	
				-L -W	-L-W-H	-L-W-H-A
E3	BD-VHL	AD-HIF	EGLN3	1:15 – 1:20	--	1:1
LCK	BD-FceRly	AD-SYK	LCK	1:15 – 1:20	1:2,5	--
2H-WT	BD-EGLN3	AD-HIF	--	1:20	--	1:1
2H-mut	BD-EGLN3	AD-mutP564A	--	1:20	--	

Tabla IV. DILUCIONES DEL PREINÓCULO DE PARTIDA PARA CADA SISTEMA (E3, LCK o 2H) EN CADA MEDIO DE CULTIVO. Véase apartado 8.1 y 8.2, Figuras 9 y 10.

8.2. Ensayos de inhibidores (Figura 10)

En los ensayos en los que se determinaba el efecto de fármacos, éstos se añadían al medio de cultivo al inicio del experimento (tiempo 0) y se medía la turbidez ($DO_{620\text{ nm}}$) del cultivo a tiempo inicial y a tiempo final teniendo en cuenta que el crecimiento de los cultivos se encontraba en fase exponencial a tiempo final (Figura 10). Para realizar los cálculos de porcentaje de crecimiento, a la turbidez ($DO_{620\text{ nm}}$) a tiempo final se le restaba la turbidez a tiempo cero. El crecimiento de cada punto se expresa como porcentaje del control sin tratamiento:

$$\% \text{ CRECIMIENTO} = \frac{[(D.O._{620\text{ nm}}(t) - D.O._{620\text{ nm}}(t_0))_{\text{con droga}}]}{[(D.O._{620\text{ nm}}(t) - D.O._{620\text{ nm}}(t_0))_{\text{control}}]}$$

Figura 9

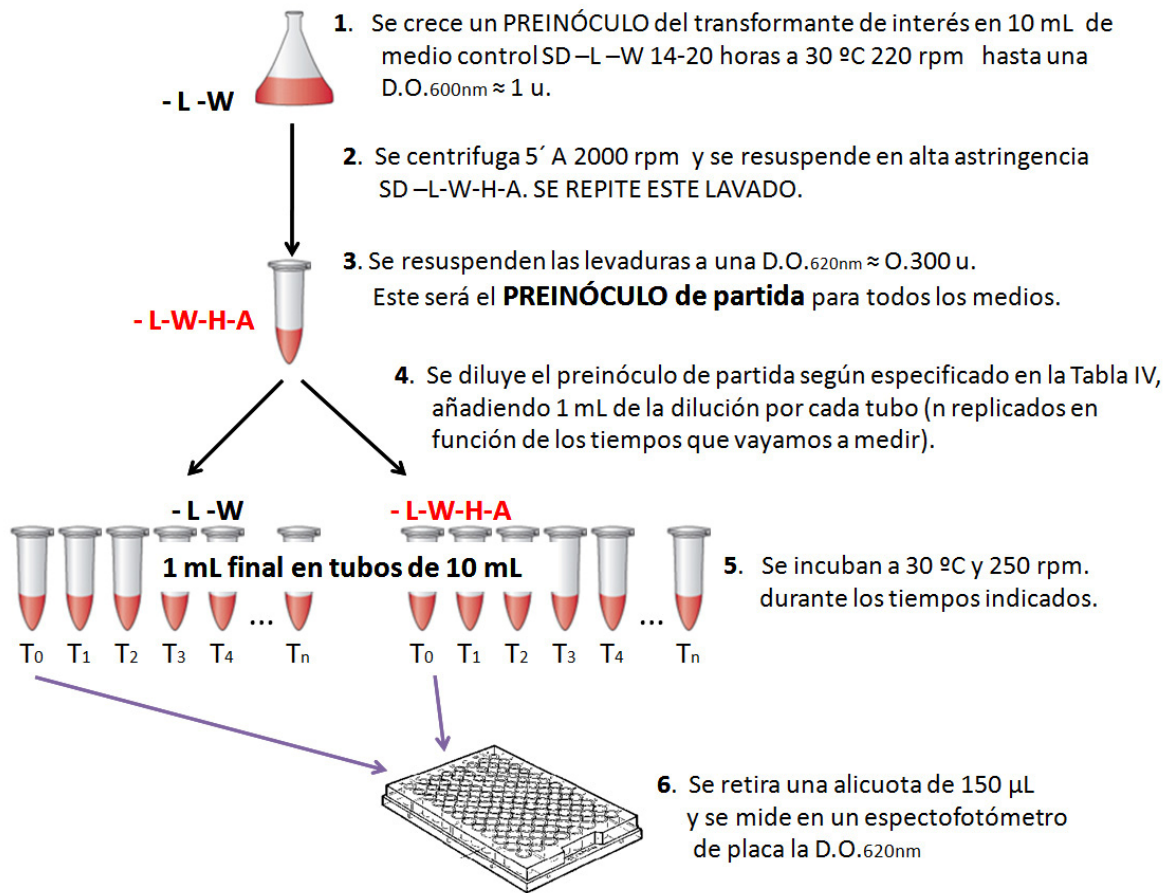


Diagrama esquemático del protocolo utilizado para los ensayos cinéticos en medio líquido.

Figura 10

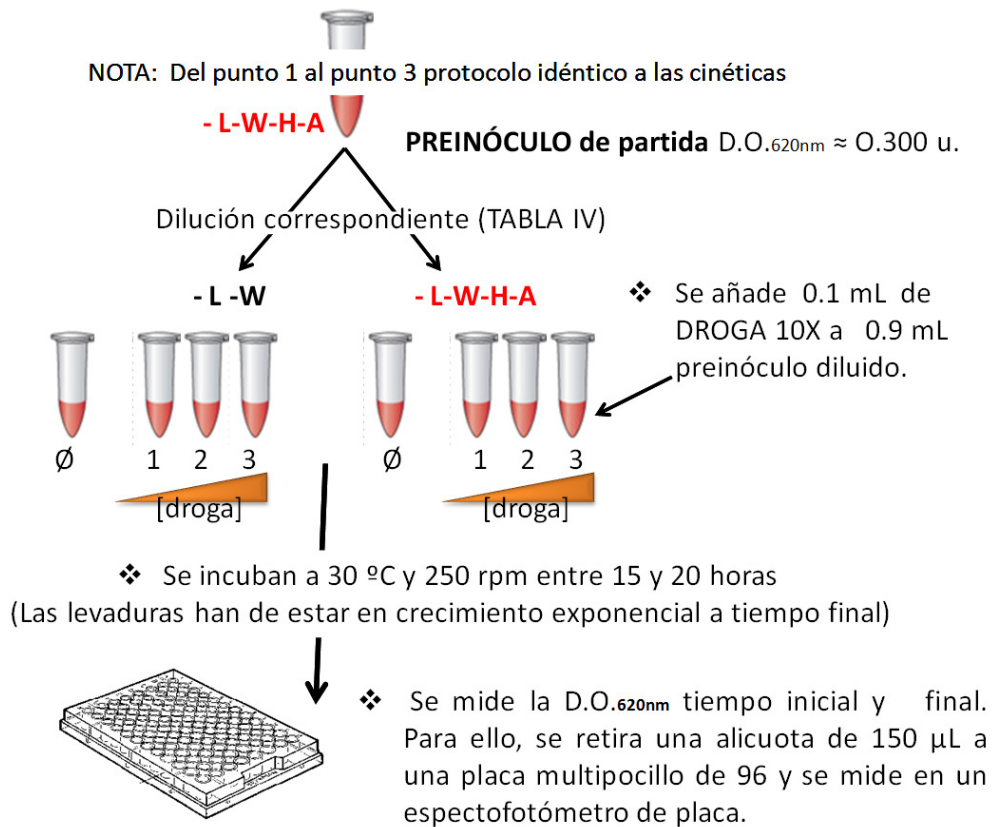


Diagrama esquemático del protocolo utilizado para los ensayos con drogas en medio líquido. Véase Figura 9 (hasta el punto 3 de la Figura 9 el protocolo es el mismo para ambos ensayos).

9. ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICAS

Los datos experimentales se analizaron con la versión 4.01 del programa Prism Graph-Pad. Los datos se analizaron mediante el test ANOVA de análisis de la varianza seguido del test de comparación múltiple de Tukey.

Resultados

1. GENERACIÓN DE UN SISTEMA BASADO EN TRIPLE HÍBRIDO EN LEVADURAS QUE RECONSTITUYE LA REGULACIÓN DE HIF

1.1. Construcciones plasmídicas

Para abordar nuestro primer objetivo, en primer lugar procedimos al clonaje de las construcciones necesarias para reconstituir la maquinaria de HIF en levaduras. Para ello, clonamos un fragmento de HIF-1 α humano (residuos 554-576) que contiene la Pro564 en pauta de lectura con el dominio de activación de la transcripción de GAL4 (**AD-P564**, Figura 11A). Este fragmento es suficiente tanto para el reconocimiento por parte de EGLN [60] como para la unión a VHL [45]. Además, para comprobar la importancia de la Prolina564 de HIF en su regulación, generamos esta misma construcción mutando la P564 a alanina (**AD-P564mut**, Figura 11A). Dado que la Pro402 también es susceptible de hidroxilación y se ha visto su implicación en el control de la estabilidad de HIF [135], también generamos una construcción en la que fusionamos el fragmento de HIF-1 α que contiene dicha prolina en pauta de lectura con el dominio de activación de GAL4 (**AD-P402**, Figura 11A).

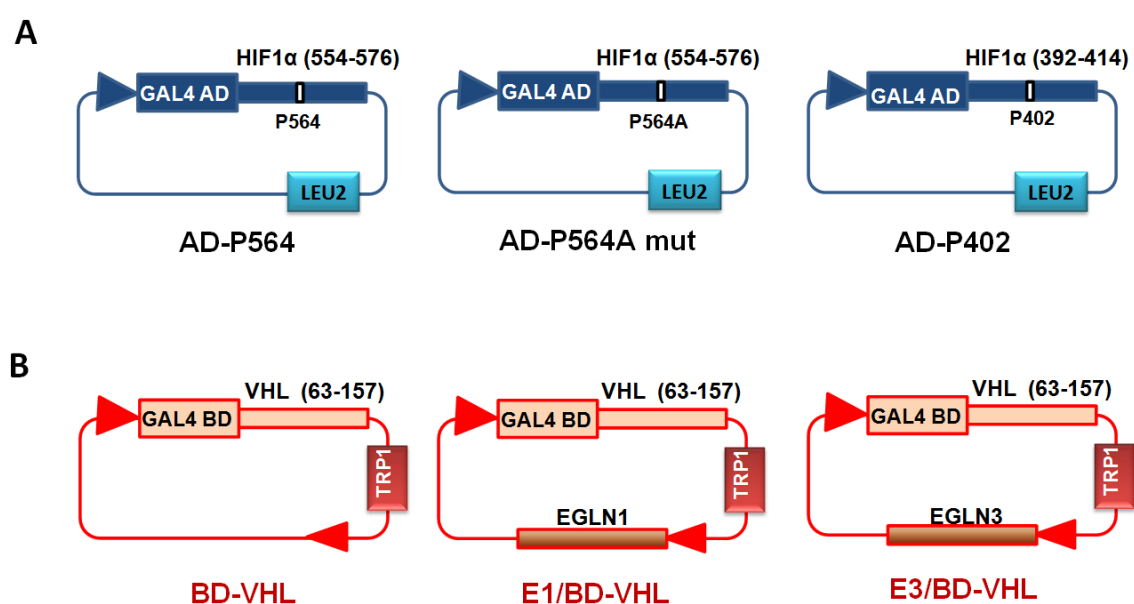


Figura 11. Esquema de las construcciones plasmídicas utilizadas en este estudio. Construcciones que codifican para las proteínas fusionadas al dominio de activación (AD) de GAL4 (A) ó el dominio de unión a DNA (BD) de Gal4 (B). A y B, Los números entre paréntesis indican la posición de los residuos inicial y final de las proteínas codificadas. LEU2 y TRP1, genes que codifican para las enzimas que permiten el crecimiento de las levaduras en ausencia de Leu y Trp respectivamente. El nombre debajo de cada construcción la identifica en el resto de esquemas y figuras.

Del mismo modo, clonamos un fragmento de VHL que codifica para el dominio β (residuos 63-157), implicado en el reconocimiento de HIF, en pauta de lectura con el

dominio de unión a DNA de GAL4 (**BD-VHL**, Figura 11B). Además, generamos otras dos construcciones derivadas de BD-VHL que además de codificar para la proteína de fusión BD-VHL expresaba EGLN1 ó EGLN3 bajo la dirección de un promotor independiente (**E1/BD-VHL** y **E3/BD-VHL** respectivamente, Figura 11B).

1.2. Caracterización del sistema

La interacción entre las diferentes proteínas de fusión se puede determinar mediante el estudio del crecimiento de las levaduras transformadas con las diferentes construcciones (Figura 11) y crecidas en medios de distinta astringencia (Figura 12).

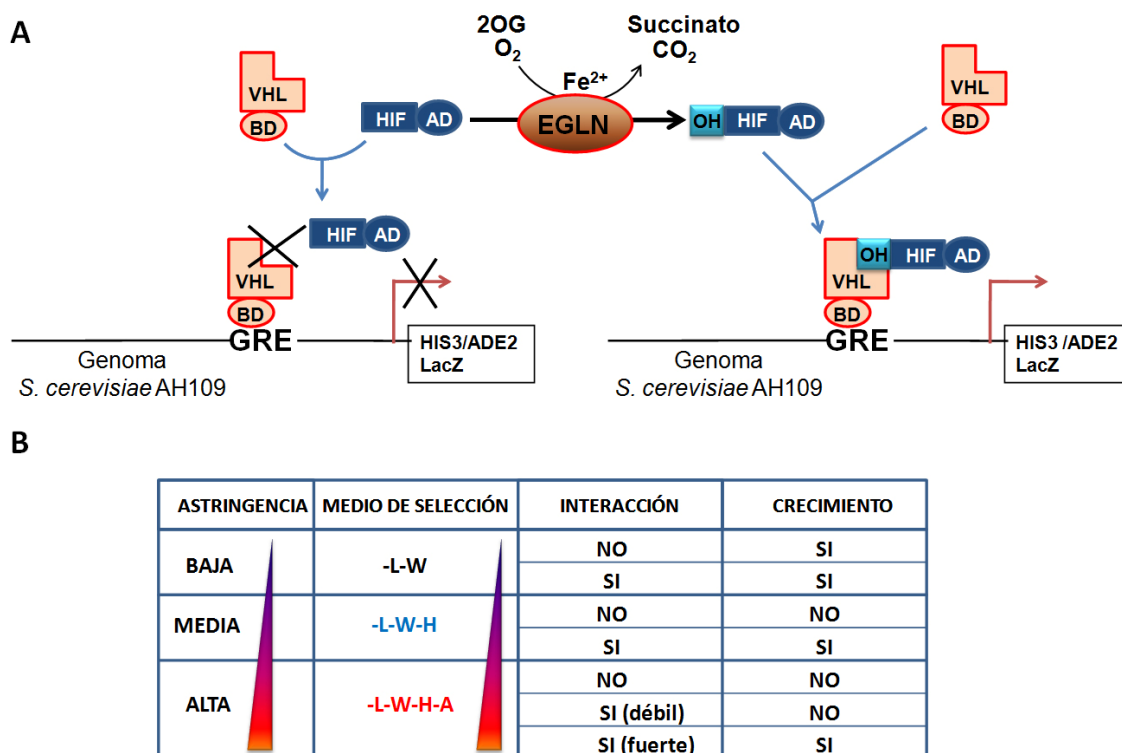


Figura 12. Figura esquemática del sistema triple híbrido EGLN/HIF/VHL. A, diagrama que representa la interacción que tiene lugar entre los distintos componentes del sistema. Sólo en presencia de EGLN, que cataliza la hidroxilación de HIF en prolina dentro de un motivo LXXLAP, se produce la interacción entre las proteínas de fusión AD-HIF/BD-VHL y por tanto el crecimiento de las levaduras en media y alta astringencia. 2OG, 2-oxoglutarato. B, tabla resumen que indica el crecimiento de las levaduras en función de la interacción entre las proteínas de fusión en los distintos medios de selección. -L-W: Ausencia de leu y trp. -L-W-H: Ausencia de leu, trp e his. -L-W-H-A: Ausencia de leu, trp, his y adenina.

Como se esquematiza en la Figura 12A, la interacción entre AD-HIF y BD-VHL sólo tiene lugar en presencia de una EGLN capaz de hidroxilar a HIF en el residuo crítico

de prolina. Podemos monitorizar dicha interacción cultivando las levaduras transformadas en medio astringente, donde el crecimiento sólo se produce cuando se transcriben los genes implicados en la síntesis de los nutrientes para los que la levadura es auxotrofa. Dicha transcripción está mediada por el factor de transcripción de GAL4 que sólo tiene actividad cuando las proteínas de fusión interaccionan (Figura 12A). El crecimiento esperado en cada tipo de medio en función de la interacción entre las proteínas de fusión está resumido en la Figura 12 B.

Se transformó la cepa de levadura AH109, auxótrofa para Leu, Trp, His y Ade, con diferentes combinaciones de las construcciones generadas y se seleccionaron los transformantes positivos para los dos plásmidos en medio carente de Leu y Trp (medio -L-W, baja astringencia, Figura 13). Esta selección se basa en que los plásmidos pBridge y pGADT7 codifican para las enzimas implicadas en rescatar la auxotrofia para estos nutrientes (Figura 11). A continuación, testamos la interacción entre las proteínas de fusión creciendo diluciones seriadas de los transformantes en ausencia de His (medio -L-W-H, media astringencia) e His y Ade (medio -L-W-H-A, alta astringencia). Como se muestra en la Figura 13A, las levaduras transformadas con AD-P564 junto con BD-VHL no crecen ni en media ni en alta astringencia, lo que sugiere la falta de interacción entre estas dos proteínas de fusión. La falta de interacción no es debida a falta de expresión de las proteínas de fusión (Figura 13C). Este resultado no sorprende teniendo en cuenta que hasta la fecha no se han descrito ortólogos de EGLN en levaduras y la unión de VHL a HIF-1 α es estrictamente dependiente de la hidroxilación en prolina [30, 31]. Además, estos datos indican que la unión de VHL a AD-P564 no hidroxilado está bajo los límites de detección de esta técnica en nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, la expresión de EGLN3 (construcción E3/BD-VHL, Figura 11B) junto con las dos proteínas de fusión, promueve la unión directa de BD-VHL a AD-P564, tal como demuestra el crecimiento de las levaduras transformadas en media y alta astringencia (Figura 13A). Quisimos comprobar si observábamos el mismo efecto al sustituir EGLN3 por la isoforma EGLN1. Como se observa en la Figura 13B, EGLN1 también promueve la unión directa entre las dos proteínas de fusión, interacción puesta de manifiesto por el crecimiento de las levaduras transformadas con E1/BD-VHL y AD-P564 en medio astringente. A continuación quisimos corroborar que la interacción observada entre las proteínas de fusión es dependiente de la hidroxilación de AD-P564 en prolina por las EGLNs. Para ello, repetimos el experimento utilizando un péptido de HIF mutado en el

que la Pro564 se sustituyó por un residuo de Alanina (construcción AD-P564Amut, Figura 11A). Como se muestra en la Figura 13B, la interacción entre AD-P564Amut y BD-VHL no se produce en presencia de ninguna de las EGLNs.

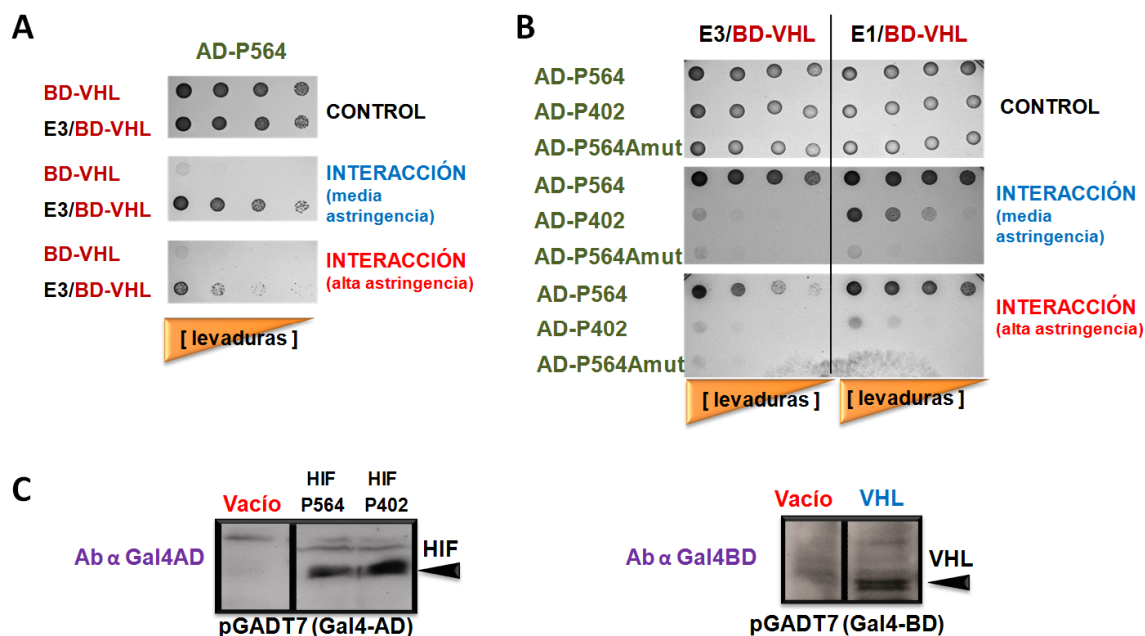


Figura 13. Caracterización de un sistema triple híbrido en levaduras que reconstituye la maquinaria reguladora de HIF. A y B, Diluciones seriadas de los clones transformados con las construcciones indicadas (véase figura 11) se crecieron en placas de baja, media o alta astringencia [CONTROL, INTERACCIÓN (media astringencia) e INTERACCIÓN (alta astringencia) respectivamente] (véase Fig. 12B). C, comprobación de la expresión de las proteínas de fusión mediante western blot empleando anticuerpos contra los dominios de activación o de unión a DNA de Gal4 (GAL4-AD y GAL4-BD, respectivamente). Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Por otro lado, se ha descrito en la literatura que las diferentes isoformas de EGLN muestran distinta preferencia por las dos secuencias diana (C-ODD y N-ODD) en HIF-1 α [59-61]. Por esta razón, quisimos determinar si en este sistema las EGLNs retenían su especificidad por el sustrato nativo. Podemos observar en la Figura 13B cómo EGLN3 hidroxila eficientemente el péptido que contiene la P564, correspondiente a la prolina del C-ODD de HIF-1 α (AD-P564), en cambio no se detecta actividad con el péptido que contiene los residuos 392-414 de HIF-1 α , pertenecientes al dominio N-ODD de HIF-1 α (AD-P402). Por el contrario, EGLN1 es capaz de hidroxilar ambas secuencias permitiendo así la unión a VHL (Figura 13B). En el caso de EGLN1, cabe matizar que su actividad es superior frente a la proteína AD-P564 que respecto a AD-P402, como queda reflejado por el menor crecimiento de las levaduras transformadas con la última

construcción en placas con medio astringente (Figura 13B). Estos resultados concuerdan perfectamente con publicaciones previas dónde se describe la actividad de las diferentes isoformas de EGLN contra distintos péptidos de HIF [60, 88, 136].

Por último, quisimos confirmar que las EGLNs conservan la especificidad de sustrato en este sistema analizando el efecto de las mutaciones L574A y L562R en el péptido de HIF correspondiente al dominio C-ODD (construcciones AD-P564, AD-P564Amut, AD-L574A, AD-L562R, Figura 14). Se ha descrito que la mutación L574A previene la hidroxilación de HIF por las EGLNs en células de mamífero [137]. En consonancia con este resultado, la expresión de cualquiera de estas isoformas de EGLN no es capaz de promover la unión de DB-VHL a AD-L574A a pesar de la presencia de un residuo intacto de prolina 564. Por el contrario, la mutación L562R afecta específicamente el reconocimiento de sustrato por EGLN3, no viéndose afectado el reconocimiento por parte de EGLN1. Estos resultados están en completo acuerdo con publicaciones previas que indican una preferencia de EGLN1, pero no de EGLN3, por residuos de arginina en posiciones particulares [60, 88].

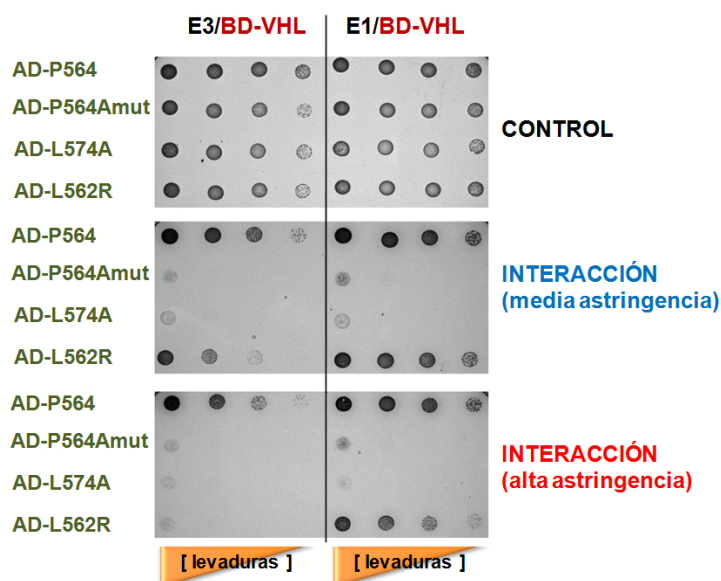


Figura 14. Caracterización de la especificidad de sustrato de las EGLN en nuestro sistema. Las construcciones AD-P564mut, AD-L574A y AD-L562R codifican para GAL4-AD fusionado a fragmentos peptídicos de HIF-1 α (residuos 554-576) que contienen las mutaciones P564A, L574A o L562R respectivamente. Diluciones seriadas de clones transformados con las construcciones indicadas se crecieron en medios de diferente astringencia. El resultado mostrado es representativo de al menos tres experimentos independientes.

Todos estos resultados en su conjunto indican que este sistema reconstituye de forma fiel la regulación de HIF por la acción secuencial de las enzimas EGLN y posterior

unión a VHL. De hecho, nuestro grupo ha utilizado este sistema para estudiar la bioquímica de estas enzimas [89]. Además, los datos presentados muestran que el dominio β de VHL es suficiente para el reconocimiento y unión a HIF en el contexto celular de nuestro sistema.

2. SISTEMA TRIPLE HÍBRIDO “HIF/EGLN/VHL” CÓMO HERRAMIENTA PARA IDENTIFICAR INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE LAS EGLNs

En el sistema triple híbrido descrito anteriormente la interacción entre las proteínas de fusión BD-VHL y AD-P564 depende estrictamente de la actividad EGLN, por esta razón pensamos que los inhibidores de estas enzimas deberían interferir con el crecimiento de las levaduras. No obstante, teníamos que diseñar los controles necesarios para diferenciar los efectos específicos de las drogas de aquellos inespecíficos, debidos bien a la fisiología de las levaduras o a la regulación de los componentes del propio sistema HIF/EGLN/VHL. Esto es, una droga capaz de inhibir el crecimiento de las levaduras en media y/o alta astringencia podría explicarse por un efecto específico sobre la interacción entre las proteínas de fusión, o bien a un efecto inespecífico sobre la expresión de dichas proteínas o sobre la viabilidad celular. Con el fin de controlar de forma sistemática la especificidad de las drogas y detectar los posibles efectos inespecíficos que afectan al crecimiento de las levaduras, generamos un conjunto de construcciones análogas a las descritas para HIF/EGLN/VHL pero basadas en interacciones proteicas no relacionadas con la ruta de HIF. Así, usamos un sistema control en el que el crecimiento de las levaduras depende de la interacción entre un dominio ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), derivado del receptor humano tipo $I\gamma$ de la IgE (Fc ϵ RI γ), y el dominio SH2 (*Src-Homology domain 2*) de la proteína Syk humana. Para que dicha interacción tenga lugar, debe acontecer la fosforilación de la tirosina fosforilable del Fc ϵ RI γ -ITAM por parte de la tirosina quinasa LCK [138].

2.1. Generación y caracterización del sistema control

Las construcciones generadas para este sistema (Figura 15A) codifican para dos dominios SH2 en tándem derivados de la proteína Syk fusionados al dominio de activación de GAL4 (AD-SH2) y para un dominio ITAM derivado de Fc ϵ RI γ fusionado al dominio de unión a DNA de GAL4 (BD-ITAM). Por último se clonó la proteína

tirosina quinasa citoplásmica LCK en el vector pBridge para inducir la fosforilación de la proteína de fusión BD-ITAM y permitir así su unión a la proteína AD-SH2 (Figura 15B).

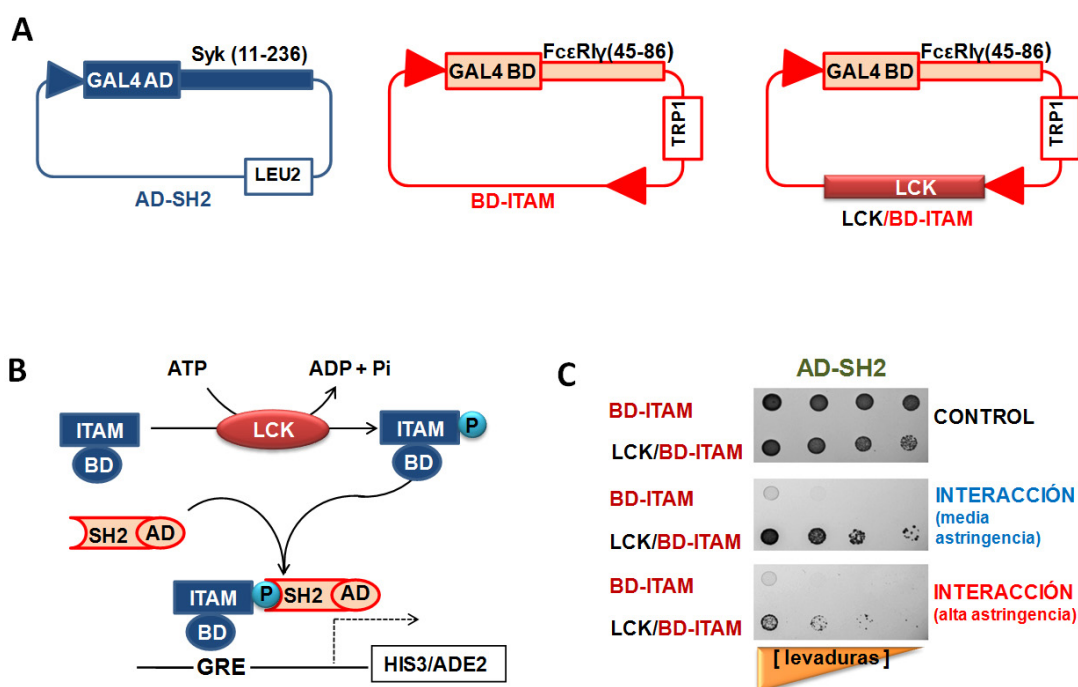


Figura 15. Descripción y caracterización de un sistema control basado en la interacción ITAM/SH2 que depende de la actividad tirosina quinasa proporcionada por la enzima LCK. A, Esquema de las construcciones triple híbrido. Los números entre paréntesis indican la posición de los residuos inicial y final de las proteínas codificadas. LEU2 y TRP1, genes que codifican para las enzimas que permiten el crecimiento de las levaduras en ausencia de Leu y Trp respectivamente. El nombre indicado debajo de cada construcción identifica a las mismas en el resto de esquemas y figuras. B, Esquema de la interacción que tiene lugar entre los distintos componentes del sistema. C, Diluciones seriadas de los clones transformados con las construcciones indicadas se crecieron en placas que carecían de Leu y Trp (CONTROL), placas de medio sin Leu, Trp e His (INTERACCIÓN, media astringencia) o placas sin Leu, Trp, His y adenina (INTERACCIÓN, alta astringencia). Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Como puede verse en la Figura 15C, las proteínas de fusión AD-SH2 y BD-ITAM no interaccionan en ausencia de la tirosina quinasa LCK. En cambio, cuando coexpresamos ésta última en el ensayo, vemos interacción significativa entre las dos proteínas de fusión, tal y como ha sido descrito previamente en la literatura [138].

De este modo, los sistemas basados en LCK (Figura 15) y EGLN (Figura 12) son análogos en cuanto a los tres componentes que lo integran: una enzima y dos proteínas de fusión cuya interacción permite el crecimiento de las levaduras en medio restrictivo. Además, en ambos sistemas la interacción entre las proteínas de fusión, y por tanto el crecimiento, requiere la modificación de una de estas proteínas por parte del enzima. Por

último, las proteínas de ambos sistemas se expresan bajo el control de los mismos promotores, ya que están clonadas en vectores idénticos, por lo que cualquier efecto inespecífico a este nivel debería afectar al crecimiento de las levaduras en ambos sistemas. Así, si los efectos de las drogas son específicos sobre nuestro sistema HIF/VHL/EGLN, sólo afectarán al crecimiento de las levaduras transformadas con estas construcciones. Por último, tenemos un control interno adicional para descartar aquellas drogas que tengan un efecto tóxico sobre la fisiología de las levaduras. Es el medio de baja astringencia ó medio CONTROL que carece de leucina y triptófano (Figura 12). El crecimiento de las levaduras en este medio no requiere la interacción entre las proteínas de fusión (tan solo que estén transformadas con los plásmidos pBridge y pGADT7 que rescatan la auxotrofia para leu y trp) y por tanto, no debe verse afectado por la presencia de una droga, siempre que ésta no sea tóxica para las levaduras.

3. ADAPTACIÓN DEL SISTEMA A MEDIO LÍQUIDO

Antes de comenzar a estudiar el efecto de drogas sobre los sistemas descritos, quisimos optimizar la forma de cuantificar el crecimiento de las levaduras. Para ello, decidimos utilizar el crecimiento en medio líquido pues presenta dos ventajas. En primer lugar, la medida de la turbidez del cultivo es un dato cuantitativo que refleja el crecimiento de las levaduras. Por el contrario, el crecimiento en placa (Figuras 13, 14 y 15) sólo permite una determinación cualitativa del efecto sobre el crecimiento. Aunque inicialmente valoramos la densitometría de colonias crecidas en medio sólido, tras varios intentos lo descartamos ya que no obteníamos valores reproducibles debido a la heterogeneidad de las colonias de levaduras. Además, nos enfrentamos a problemas técnicos derivados de la adquisición de la imagen, la relación señal/ruido en algunas zonas de la placa generaban falsos positivos y/o falsos negativos. En segundo lugar, los ensayos en medio líquido permiten facilitar la aplicación de concentraciones precisas de droga, además de consumir menos compuesto abaratando así el ensayo. Por estas razones pensamos entonces en trasladar los sistemas ya descritos a medio líquido.

3.1. Determinación del rango de crecimiento exponencial para cada sistema

Con el fin de utilizar la densidad óptica del cultivo como lectura final del cambio en la actividad enzimática de nuestros sistemas, en primer lugar necesitábamos conocer el rango de crecimiento exponencial de los distintos cultivos en los medios CONTROL (-L-

W) y RESTRICTIVO (-L-W-H ó -L-W-H-A). Para este fin, aislamos colonias de levaduras transformadas con las distintas construcciones (AD-P564 y E3/BD-VHL, sistema E3, Figura 11 ó AD-SH2 y LCK/BD-ITAM, sistema LCK, Figura 15) las resuspendemos en los diferentes medios a la densidad óptica determinada previamente con el fin de obtener el rango de crecimiento exponencial de todos los cultivos en ventanas de tiempo solapantes (véase materiales y métodos, apartado 8.1). En la Figura 14 se muestran los valores absolutos densidad óptica a 620 nm a distintos tiempos tras la inoculación.

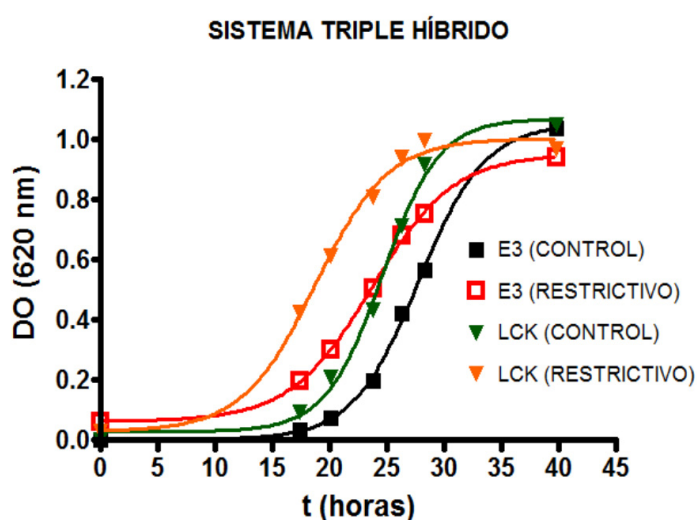


Figura 16. Cinéticas de crecimiento en medio líquido.

Las levaduras se transforman con las construcciones que expresan AD-P564 y E3/BD-VHL (E3) o AD-SH2 y LCK/BD-ITAM (LCK) (Figuras 11 y 15). Tras la transformación, las células se seleccionan en placas en ausencia de Leu y Trp. Se aíslan clones individuales transformados y se resuspenden en el medio líquido correspondiente. La concentración inicial de cada cultivo fue determinada en experimentos preliminares de modo que todos los cultivos alcanzasen el crecimiento logarítmico en ventanas de tiempo solapantes (véase materiales y

métodos, apartado 8.1). La figura muestra las densidades absolutas de cada cultivo a diferentes tiempos tras la inoculación. Se muestra un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes.

En las condiciones de nuestro ensayo, los diferentes cultivos presentaban una ventana de tiempo desde las 16 hasta las 25 horas de crecimiento en la que se encontraban en fase de crecimiento exponencial.

4. VALIDACIÓN DEL SISTEMA TRIPLE HÍBRIDO COMO HERRAMIENTA QUE PERMITE IDENTIFICAR MODULADORES DE LAS EGLNs

Una vez fijadas las condiciones de crecimiento en medio líquido, quisimos comprobar si la combinación de los dos sistemas descritos anteriormente (sistemas E3/VHL/HIF y LCK/ITAM/SH2) permitiría detectar moléculas capaces de interferir con la regulación de HIF. En primer lugar decidimos utilizar sustancias ampliamente utilizadas para mimetizar la activación de HIF por hipoxia como el cloruro de cobalto y la

deferroxamina [30, 31]. Puesto que las EGLNs precisan Fe^{2+} unido en el centro catalítico como cofactor para la reacción de hidroxilación, los quelantes de hierro como la deferroxamina inhiben la actividad EGLN. El mecanismo por el que el cloruro de cobalto inhibe las EGLNs es controvertido [139, 140]. Podría estar actuando desplazando al hierro del sitio catalítico de la enzima y/o interferir con el transporte de ascorbato, el cual se precisa para prevenir la oxidación del centro catalítico de las EGLNs. En nuestros ensayos, el cloruro de cobalto tiene un importante efecto tóxico en las levaduras a las dosis más altas y ejerce poca inhibición específica del sistema EGLN a dosis intermedias (Figura 17A). Por otro lado, la deferroxamina no ejerció ningún efecto significativo sobre el crecimiento de las levaduras ni a las dosis más elevadas de 1 mM (Figura 17B).

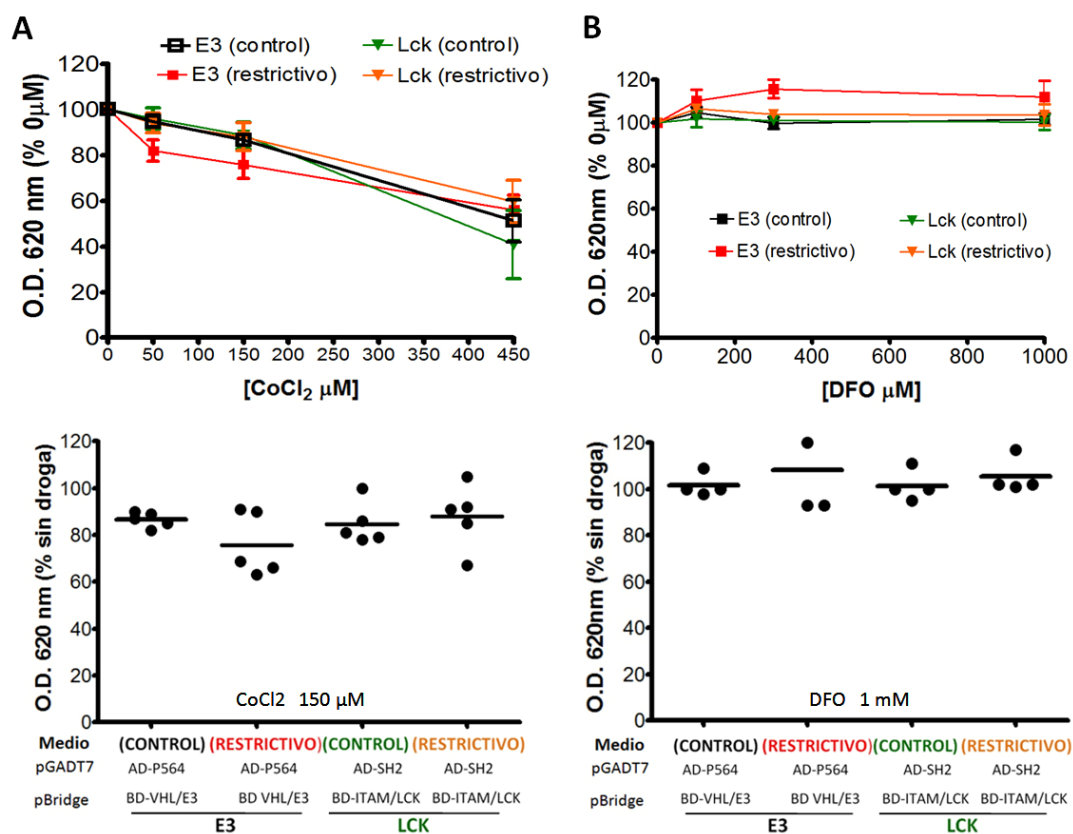


Figura 17. Efecto del CoCl_2 y la Deferroxamina (DFO) en los sistemas triple híbrido dependientes de EGLN y LCK. Las levaduras transformadas con las construcciones que codifican para AD-P564 y E3/BD-VHL (E3) o AD-SH2 y LCK/BD-ITAM (LCK) se inocularon en medio sin Leu ni Trp (CONTROL) o medio carente de Leu, Trp e His (RESTRICTIVO, en el caso de los clones E3 el medio restrictivo también carecía de Adenina). Los cultivos celulares se crecieron en presencia de CoCl_2 0, 50, 150 o 450 μM (A) ó en presencia de DFO 0, 0.1, 0.3 o 1 mM (B), en ambos casos la densidad de los cultivos se determinó a las 16-24 horas tras la inoculación. La densidad celular (absorbancia a 620 nm) de cada cultivo se representa como el porcentaje de densidad respecto a las células crecidas en ausencia de droga. El gráfico superior representa el valor promedio de cinco experimentos independientes. Las barras verticales representan el error estándar de la media. En la parte inferior se representan los valores individuales de densidad óptica para los cultivos crecidos en presencia de CoCl_2 150 μM (A) ó en presencia de DFO 1mM (A). En ambos casos la barra horizontal representa la media de los 5 experimentos.

Puesto que, tanto el cloruro de cobalto como la deferoxamina son compuestos muy inespecíficos, decidimos probar otras moléculas no quelantes de hierro que actúan como inhibidores de las EGLNs. Tal es el caso del S956711 [6-cloro-3-hidroxiquinolina-2-ácido carbónico-N-carboximetilamida] [123] y del DMOG (dimetiloxalilglicina) [127, 141]. Estas moléculas tienen un efecto más específico sobre la actividad catalítica, si bien el mecanismo de inhibición de las mismas no se ha caracterizado. El S956711, que fue desarrollado como un inhibidor de las hidroxilasas dependientes de 2-OG en terapia antifibrótica, podría estar interfiriendo en la unión de algún cofactor al centro activo del enzima o incluso con la unión a su sustrato, HIF.

Como se muestra en la Figura 18A, el tratamiento con dosis crecientes de S956711 tiene un fuerte efecto en el crecimiento de las levaduras que expresan AD-HIF y BD-VHL/EGLN3 en medio restrictivo. En cambio, este compuesto no tiene efecto sobre el crecimiento de estas células en medio control, donde no se precisa interacción entre las proteínas de fusión para permitir el crecimiento. El crecimiento en medio control muestra que el S956711 ejerce un ligero efecto tóxico a dosis elevadas (100 μ M). Por lo tanto, el efecto de S956711 no se debe a una acción inespecífica sobre el crecimiento y la viabilidad de las levaduras. Para confirmar la especificidad del efecto de S95 sobre el sistema de HIF, testamos este inhibidor en las levaduras transformadas con AD-SH2 y BD-ITAM/LCK. Como se muestra en la Figura 18, S956711 no tiene un efecto significativo en este sistema control independientemente del medio en el que se cultive. Estos resultados descartan la posibilidad de que la inhibición del sistema EGLN pudiera deberse a efectos colaterales del S956711 en la transcripción y/o traducción de las proteínas de fusión del sistema triple híbrido. Por último, el efecto inhibitorio de S956711 es altamente reproducible y los efectos inespecíficos son prácticamente indetectables a dosis inferiores a 100 μ M (Figura 18B).

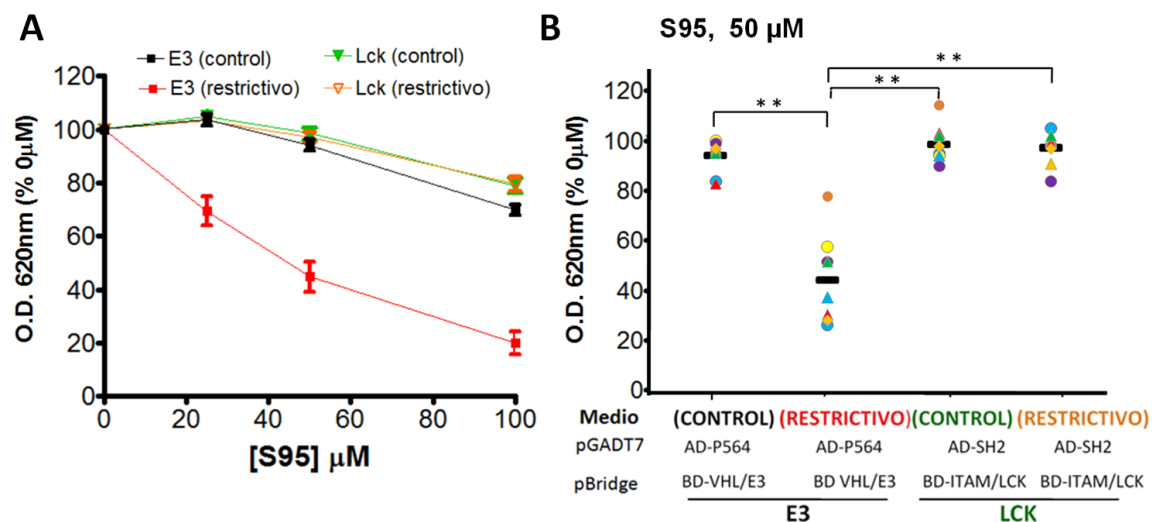


Figura 18. Efecto del S956711 en los sistemas triple híbrido dependientes de EGLN y LCK. Las levaduras transformadas con las construcciones que codifican para AD-P564 y E3/BD-VHL (E3) o AD-SH2 y LCK/BD-ITAM (LCK) se inocularon en medio sin Leu ni Trp (CONTROL) o medio carente de Leu, Trp e His (RESTRICTIVO), en el caso de los clones E3 el medio restrictivo también carecía de Adenina). Los cultivos celulares se crecieron en presencia de S956711 0, 25, 50 o 100 μM. La densidad de los cultivos se determinó a las 16-24 horas tras la inoculación. A, La densidad celular (absorbancia a 620 nm) de cada cultivo se representa como el porcentaje de densidad respecto a las células crecidas en ausencia de droga. El gráfico representa el valor promedio de nueve experimentos independientes. Las barras verticales representan el error estándar de la media. B, Se representan los valores individuales de densidad para los cultivos crecidos en S956711 50 μM. La barra horizontal representa la media. Los asteriscos indican valores promedio estadísticamente significativos ($p < 0.001$).

Por su parte, el DMOG podría comportarse como un inhibidor competitivo del 2-oxoglutarato, cuya unión en el centro activo del enzima es necesaria para catalizar la reacción de hidroxilación [96, 127]. De forma similar al S956711, el tratamiento con DMOG también resultó en una inhibición dependiente de dosis de la interacción entre AD-HIF y BD-VHL (Figura 19A). Como se mostró para S956711, la inhibición con DMOG también es específica sobre la maquinaria de regulación de HIF, puesto que no se observan efectos en la interacción AD-SH2 con BD-ITAM (Figuras 19A y 19B).

En resumen, los resultados obtenidos para estas drogas demuestran que la combinación de estos sistemas permite identificar compuestos capaces de ejercer una inhibición específica sobre las EGLNs. Además, hemos de resaltar que el efecto del S956711 y DMOG en nuestro sistema se alcanza a dosis equivalentes a aquellas requeridas para la inhibición de las EGLNs en células de mamífero [123, 141].

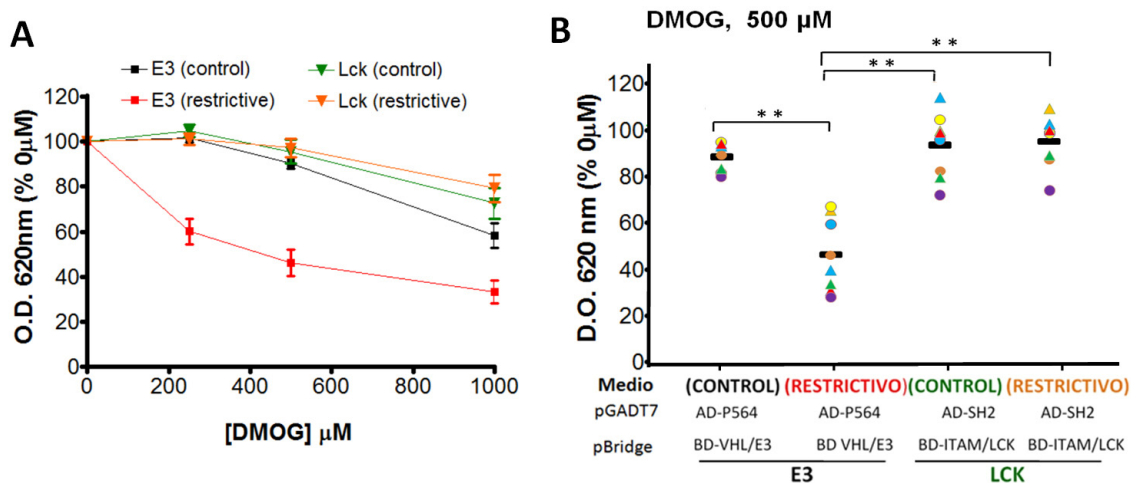


Figura 19. Efecto del DMOG en los sistemas triple híbrido dependientes de EGLN y LCK. Las levaduras transformadas con las construcciones que codifican para AD-P564 y E3/BD-VHL (E3) o AD-SH2 y Lck/BD-ITAM (Lck) se inocularon en medio sin Leu ni Trp (CONTROL) o medio carente de Leu, Trp e His (RESTRICTIVO, en el caso de los clones E3 el medio restrictivo también carecía de Adenina). Los cultivos celulares se crecieron en presencia de DMOG 0, 250, 500 o 1000 µM. La densidad de los cultivos se determinó a las 16-24 horas tras la inoculación. A, La densidad celular (absorbancia a 620 nm) de cada cultivo se representa como el porcentaje de densidad respecto a las células crecidas en ausencia de droga. El gráfico representa el valor promedio de nueve experimentos independientes. Las barras verticales representan el error estándar de la media. B, Se representan los valores individuales de densidad para los cultivos crecidos en DMOG 500 µM. La barra horizontal representa la media. Los asteriscos indican valores promedio estadísticamente significativos ($p < 0.001$).

5. OTROS MODULADORES DE LAS EGLNs

Una vez validado el sistema mediante el estudio de inhibidores específicos, conocidos y bien caracterizados, de las EGLNs (Figuras 18 y 19), decidimos investigar el efecto de otras moléculas que afectan a la ruta de HIF, pero de las que se desconoce su diana molecular.

5.1. 15d-PGJ₂, ¿Un inhibidor de las EGLNs?

La prostaglandina 15d-PGJ₂ es un agonista de PPAR γ (“*Peroxisome Proliferator-activated receptor-gamma*”) que parece estabilizar la proteína HIF-1 α sin afectar los niveles de mRNA ni la actividad proteosomal [142]. Por ello, quisimos estudiar el efecto de la 15d-PGJ₂ sobre la actividad EGLN en nuestro sistema triple híbrido. Como se muestra en la Figura 20A, el tratamiento con dosis crecientes de 15d-PGJ₂ tiene un efecto importante sobre el crecimiento de las levaduras que expresan AD-HIF y E3/BD-VHL en medio restrictivo que además es dependiente de dosis. Sin embargo, este compuesto

también tiene un efecto tóxico a la dosis más alta (5 mM), como refleja la disminución de crecimiento del sistema E3 en medio control.

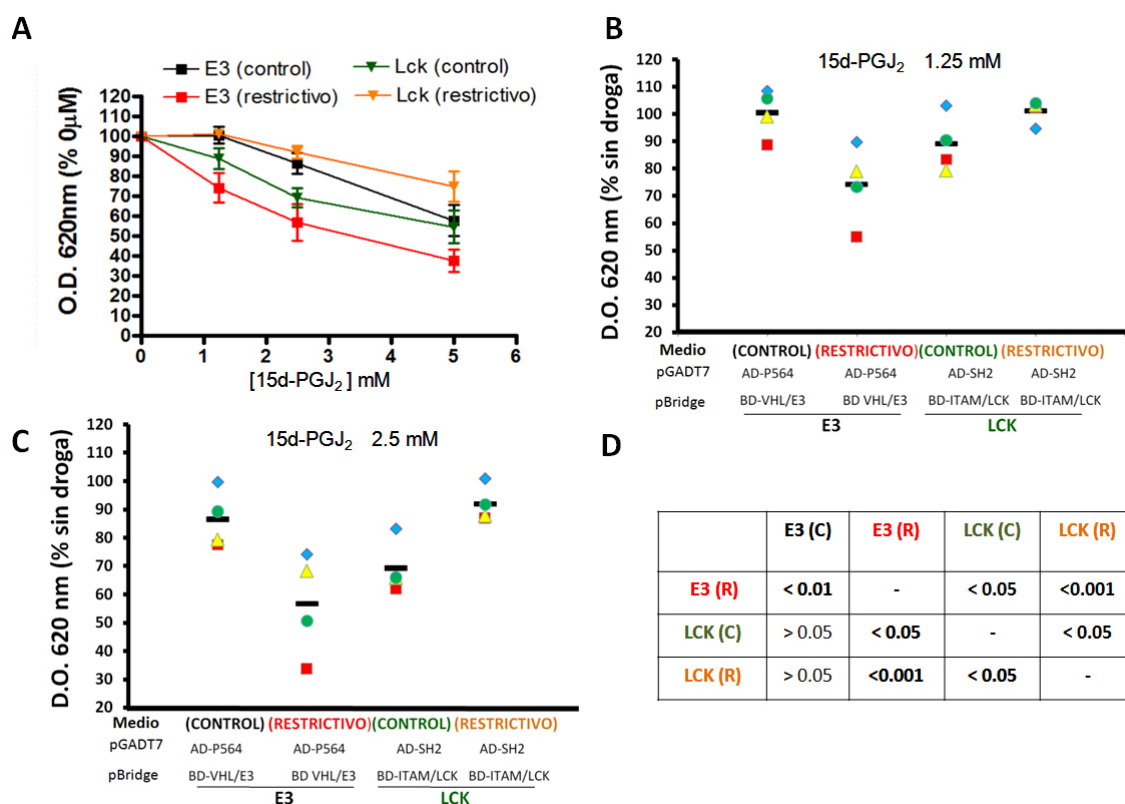


Figura 20. Efecto de la 15d-PGJ₂ en los sistemas triple híbrido dependientes de EGLN y LCK. Las levaduras transformadas con las construcciones que codifican para AD-P564 y E3/BD-VHL (E3) o AD-SH2 y Lck/BD-ITAM (LCK) se inocularon en medio sin Leu ni Trp (CONTROL) o medio carente de Leu, Trp e His (RESTRICTIVO, en el caso de los clones E3 el medio restrictivo también carecía de Adenina). Los cultivos celulares se crecieron en presencia de 15d-PGJ₂ 0, 1.25, 2.5 o 5 mM. La densidad de los cultivos se determinó a las 16-24 horas tras la inoculación. A, La densidad celular (absorbancia a 620 nm) de cada cultivo se representa como el porcentaje de densidad respecto a las células crecidas en ausencia de droga. El gráfico representa el valor promedio de cuatro experimentos independientes. Las barras verticales representan el error estándar de la media. B y C, Se representan los valores individuales de densidad para los cultivos crecidos en 15d-PGJ₂ 1.25 mM (B) ó 15d-PGJ₂ 2.5 mM (C). La barra negra horizontal representa la media de los cuatro experimentos. D, Tabla resumen que representa los valores de p obtenidos tras realizar el test estadístico a los datos de los cuatro experimentos independientes.

Por otro lado, a diferencia que el DMOG y el S956711, la 15d-PGJ₂ si tiene un efecto sobre el crecimiento de las levaduras transformadas con el sistema LCK. Así, podemos observar cómo incluso a las dosis intermedias de 2.5 mM, la 15d-PGJ₂ tiene un efecto inespecífico sobre la viabilidad celular, disminuyendo el crecimiento de las levaduras LCK en medio control hasta un 30% respecto al medio sin droga. Por el contrario, esta misma dosis de 15d-PGJ₂ parece aumentar la interacción entre las proteínas AD-SH2 y DB-ITAM/LCK como se deduce del incremento observado en el

crecimiento de las levaduras transformadas con estas construcciones en medio restrictivo respecto al medio control. Así pues, si analizamos los valores individuales de los cuatro experimentos a la dosis de 1.25 y 2.5 mM (Figuras 20B y 20C), observamos una gran dispersión entre experimentos individuales para cada medio de cultivo. Sin embargo, la tendencia observada sí es reproducible en los diferentes experimentos y pone de manifiesto una disminución (estadísticamente significativa) en el crecimiento del sistema E3 en medio restrictivo, así como un aumento en el crecimiento de las levaduras LCK en el mismo medio. Por lo tanto, con independencia del efecto tóxico observado a altas dosis, parece que la 15d-PGJ₂ podría estar actuando a diferentes niveles en los dos sistemas (E3 y LCK): En el sistema E3 parece disminuir específicamente la interacción entre AD-HIF y BD-VHL, como podemos deducir del menor crecimiento en medio restrictivo respecto a medio control de las levaduras transformadas con estas construcciones. En cambio, en el sistema control (LCK), la 15d-PGJ₂ parece activar la interacción entre las proteínas de fusión AD-SH2 y DB-ITAM. En resumen, el efecto sobre el sistema control (LCK), aunque inesperado, parece confirmar que la inhibición sobre EGLN3/HIF es específica.

5.2. R59949. ¿Un activador de la actividad prolil hidroxilasa?

Todas las moléculas testadas hasta el momento en nuestro sistema son inhibidores de las EGLNs y, por tanto, provocaban la estabilización de HIF en normoxia. Nos preguntamos a continuación si el sistema también detectaría moléculas capaces de aumentar la tasa de degradación de HIF en mamíferos, lo que se traduciría en un aumento del crecimiento de las levaduras en medio astringente. Para ello, decidimos testar en nuestro sistema el compuesto R59949, un inhibidor de diacilglicerol kinasas, capaz de interferir con la acumulación de HIF-1/2 α que tiene lugar en hipoxia sin afectar la expresión de sus mRNAs [119]. El grupo del Dr. Landázuri demostró además que el efecto de esta droga sobre HIF requiere VHL, pues no se observa en células VHL^{-/-}. De hecho, la unión de VHL a HIF- α endógeno aumenta tras el tratamiento con R59949, incluso en condiciones de hipoxia. Finalmente, parece que esta droga es capaz de estimular la actividad prolil hidroxilasa tanto en normoxia como en hipoxia [119]. En la Figura 21 se muestra el efecto del R59949 en los sistemas triple híbrido dependientes de EGLN y LCK. Las levaduras transformadas con las construcciones que codifican para AD-P564 y E3/BD-VHL (E3) o AD-SH2 y LCK/BD-ITAM (LCK) se inocularon en

medio sin Leu ni Trp (control) o carente de Leu, Trp e His (restrictivo). Como se aprecia en la Figura 21A y 21B, el R59949 tiene un elevado efecto tóxico sobre las levaduras de nuestro sistema triple híbrido. Dicho efecto se pone de manifiesto por el bajo crecimiento que experimentan las levaduras en presencia de la droga en medio control. El crecimiento observado en el medio control con R59949 35 μ M es de un 70% respecto al medio sin droga (Figura 21A), efecto que se acentúa a concentraciones ligeramente superiores (40 μ M) viendo una disminución en el crecimiento de hasta un 50% en medio control (Figura 21B).

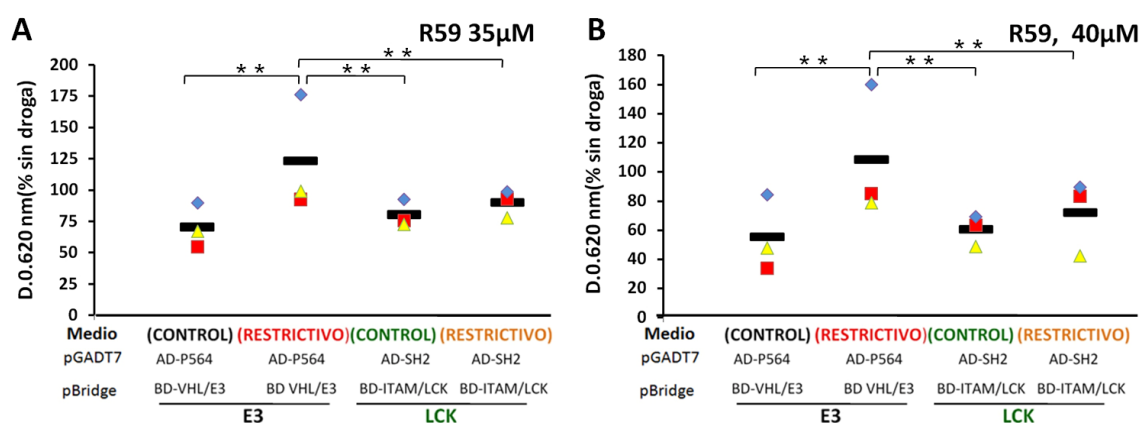


Figura 21. Efecto del R59949 en los sistemas triple híbrido dependientes de EGLN y LCK. Las levaduras transformadas con las construcciones que codifican para AD-P564 y E3/BD-VHL (E3) o AD-SH2 y LCK/BD-ITAM (LCK) se inocularon en medio sin Leu ni Trp (CONTROL) o medio carente de Leu, Trp e His (RESTRICTIVO, en el caso de los clones E3 el medio restrictivo también carecía de Adenina). A, Los cultivos celulares se crecieron en presencia de R59949 0, 35 o 40 μ M. La densidad de los cultivos se determinó a las 16-24 horas tras la inoculación. La densidad celular (absorbancia a 620 nm) de cada cultivo se representa como el porcentaje de densidad respecto a las células crecidas en ausencia de droga. El gráfico representa los valores individuales de densidad óptica para los cultivos crecidos en presencia de R59949 35 μ M (A) o 40 μ M (B). La barra horizontal representa la media de 3 experimentos. Los asteriscos indican valores promedio estadísticamente significativos ($p < 0.001$).

A pesar del efecto tóxico observado, las levaduras del sistema E3 experimentan un aumento en el crecimiento en medio restrictivo. Este efecto, sin embargo, no se observa en el sistema control dependiente de LCK, por lo que concluimos que se debe a una acción específica sobre el sistema EGLN/HIF. De hecho, este efecto podría deberse a una activación de la actividad protil hidroxilasa y/o unión EGLN3 a HIF y/o unión de HIF hidroxilado a VHL, lo que estaría en consonancia con los datos previamente publicados en nuestro laboratorio [119].

6. SISTEMA DOBLE HÍBRIDO EGLN3/HIF

Los datos mostrados indican que podemos utilizar el sistema triple híbrido E3/HIF/VHL como herramienta de búsqueda de inhibidores y activadores de las EGLNs. Sin embargo este sistema no nos permite discernir si la droga está actuando a nivel de unión al sustrato o a nivel de actividad enzimática EGLN. Por ejemplo los resultados de la Figura 18 no permiten diferenciar si S956711 inhibe la actividad catalítica de EGLN3, su interacción con HIF ó, incluso, la unión de VHL a HIF hidroxilado. Datos previos obtenidos en nuestro grupo indicaban que la interacción entre EGLNs y su sustrato HIF es lo suficientemente estable como para ser detectada en ensayos de *pull down* con GST (Figura 22). Este resultado sugería la posibilidad de estudiar la interacción que tiene lugar entre HIF y las EGLNs mediante ensayos de doble híbrido. En concreto estos ensayos nos permitirían determinar si el efecto inhibitor se desarrolla a nivel de la interacción entre el enzima y su sustrato y por tanto estudiar el mecanismo de acción de las drogas.

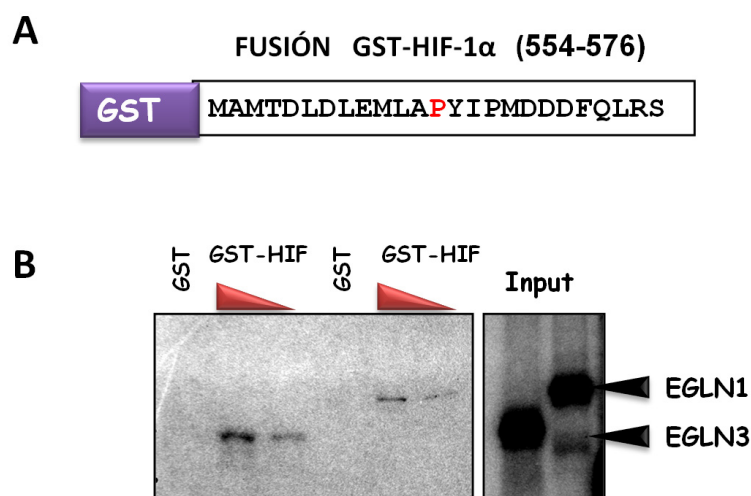


Figura 22. Ensayos de unión in vitro GST-HIF/EGLN. A, secuencia de HIF-1 α fusionada a GST utilizada para los ensayos de pull down. B, EGLN1 y EGLN3 marcadas radiactivamente con [^{35}S]-met se incubaron con la proteína recombinante GST-HIF y esferas de glutatión agarosa. Las [^{35}S]-EGLNs unidas a GST-HIF fueron visualizadas por autoradiografía. Los carriles de la derecha muestran las bandas correspondientes a las [^{35}S]-EGLNs cargadas directamente en el gel. El resultado mostrado es representativo de tres experimentos independientes.

6.1. Caracterización del sistema doble híbrido

Para desarrollar este sistema, se clonó EGLN3 en pBridge bajo el control del promotor P_{ADHI} , que dirige la expresión del enzima fusionada al dominio de unión a DNA de GAL4, construcción BD-E3 (Figura 23A). Si la interacción de EGLN3 con su sustrato (AD-P564 en este caso) es lo suficientemente estable, la transformación de los plásmidos que codifican para BD-E3 y AD-P564 debe reconstituir el factor de transcripción GAL4 y permitir el crecimiento de las levaduras en medio astringente (Figura 23B). De acuerdo con los ensayos de *pull down* (Figura 22), comprobamos que las dos proteínas de fusión interaccionan en el ensayo de doble híbrido, como muestra el crecimiento de las levaduras en medio astringente (Figura 23C). En cambio, la interacción se perdía al enfrentar BD-EGLN3 a AD-P564A mut, donde la prolina hidroxilable de HIF se ha mutado por alanina, como muestra la falta de crecimiento de las levaduras en medio astringente (Figura 23C).

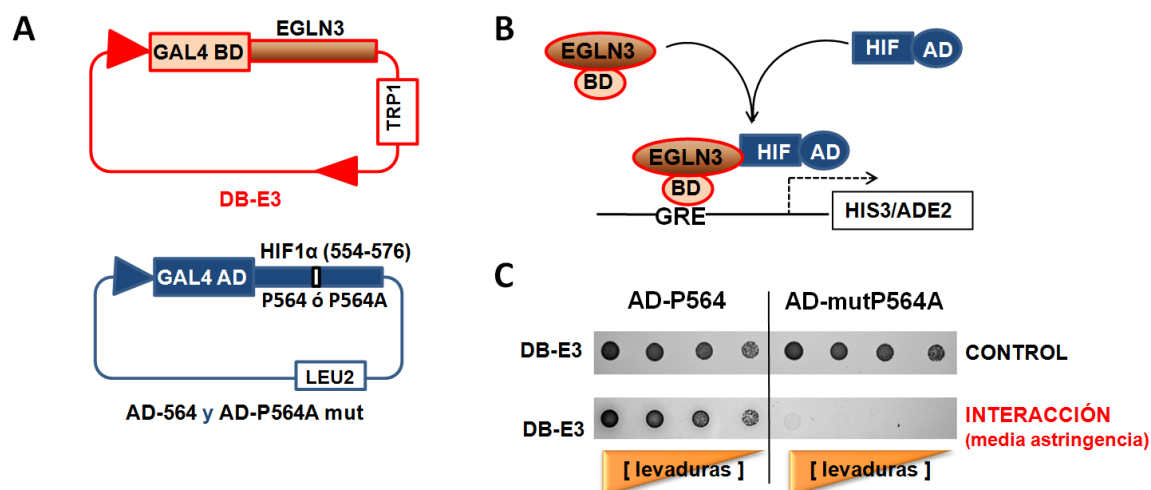


Figura 23. Caracterización del sistema doble híbrido en levaduras E3/HIF. A, Esquema de las construcciones triple híbrido. Los números entre paréntesis indican la posición de los residuos inicial y final de las proteínas codificadas. LEU2 y TRP1, genes que codifican para las enzimas que permiten el crecimiento de las levaduras en ausencia de Leu y Trp respectivamente. B, Esquema de la interacción que tiene lugar entre los componentes del sistema. C, Diluciones seriadas de los clones transformados con las construcciones indicadas se crecieron en placas que carecían de Leu y Trp (CONTROL) o placas sin Leu, Trp, His (INTERACCIÓN, media astringencia). Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Al igual que en el ensayo de triple híbrido E3/HIF/VHL, en el sistema doble híbrido HIF/E3, surge la necesidad de optimizar las condiciones del sistema en medio líquido con el fin de poder cuantificar el crecimiento de las levaduras de forma reproducible. En primer lugar, determinamos el rango de crecimiento exponencial de los

distintos cultivos en los medios control y restrictivo. Para ello, crecimos levaduras transformadas con las construcciones AD-P564 y BD-EGLN3 (transformante WT) en los distintos medios. Como control adicional, crecimos levaduras transformadas con AD-P564A mut junto con BD-EGLN3 (transformante P564A) con el que no esperábamos observar crecimiento en medio restrictivo (materiales y métodos, apartado 8.1). Tras representar los valores de densidad absoluta de cada cultivo a diferentes tiempos tras la inoculación obtuvimos la curva de crecimiento representada en la Figura 24. Como puede verse en dicha curva, la ventana de tiempo en la que los cultivos se encuentran en fase de crecimiento exponencial es de entorno a diez horas (desde 10 a 20 horas aproximadamente). Durante este intervalo de tiempo, se podría cuantificar el efecto que una droga ejerciera sobre la interacción HIF-EGLN3.

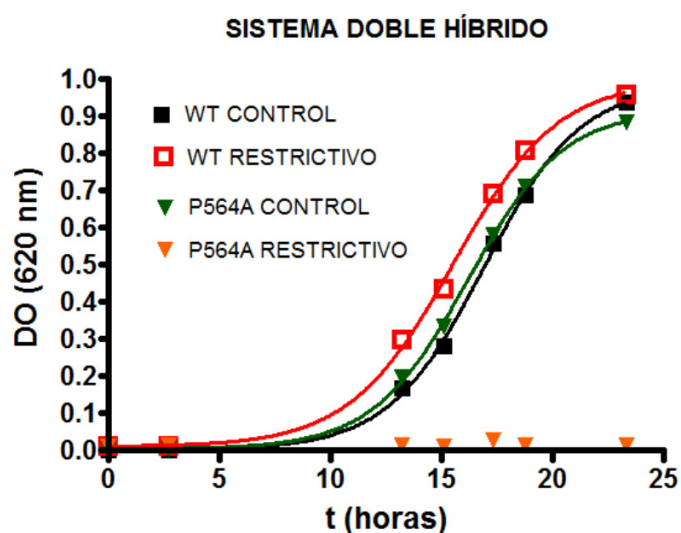


Figura 24. Cinéticas de crecimiento en medio líquido, sistema doble híbrido. Las levaduras se transforman con las construcciones que expresan AD-P564 y DB-E3 (WT) o AD-P564A mut y BD-E3 (WT). Tras la transformación, las células se seleccionan en placas en ausencia de Leu y Trp. Se aíslan clones individuales transformados y se resuspenden en el medio líquido correspondiente. La concentración inicial de cada cultivo fue determinada en experimentos preliminares de modo que todos los cultivos alcanzasen el crecimiento logarítmico en ventanas de tiempo solapantes. La figura muestra las densidades absolutas de cada cultivo a diferentes tiempos tras la inoculación. En las condiciones de nuestro ensayo, los diferentes cultivos presentaban una ventana de tiempo desde las 13 hasta las 20 horas de crecimiento en la que todas se encontraban en fase de crecimiento exponencial. Se muestra un experimento representativo de al menos dos experimentos independientes.

A continuación, estudiamos en este sistema el efecto de los inhibidores específicos de EGLN DMOG y S956711. Como ya se indicó, el DMOG, cuya estructura es análoga a la del 2-oxoglutarato (2-OG), probablemente inhiba la actividad EGLN por competición con este cosustrato de la reacción [127]. Por tanto, el DMOG debería afectar a la actividad catalítica de la EGLN (hidroxilación del sustrato), pero no a la unión al sustrato.

Para estudiar esta hipótesis, investigamos el efecto del DMOG en la unión de EGLN3 a HIF utilizando el sistema doble híbrido detallado anteriormente (Figura 23) [60]. La combinación de los sistemas doble y triple híbrido permiten comparar el efecto del DMOG en la capacidad de EGLN3 de unirse a HIF y de hidroxilarlo en la P564. Como se muestra en la Figura 25, el tratamiento con DMOG no tiene ningún efecto en la unión directa de EGLN3 a su sustrato, pues no afecta al crecimiento de las levaduras que expresan BD-EGLN3 y AD-HIF (sistema doble híbrido). Sin embargo, la misma dosis de DMOG (500 μ M) tiene un claro efecto sobre la hidroxilación de AD-HIF por EGLN3 (sistema triple híbrido, figura 25) tal y como se mostró previamente (Figura 19). Este resultado indica que, como esperábamos, el DMOG no afecta a la unión de EGLN a su sustrato. Por tanto, el efecto de esta droga en el sistema que reconstituye la regulación de HIF (Figura 25, triple híbrido y Figura 19) se debe probablemente a la inhibición de la actividad EGLN en vez de una modulación de la interacción EGLN3/HIF. Es necesario resaltar que estos resultados no descartan un potencial efecto de DMOG en la interacción VHL/HIF hidroxilado.

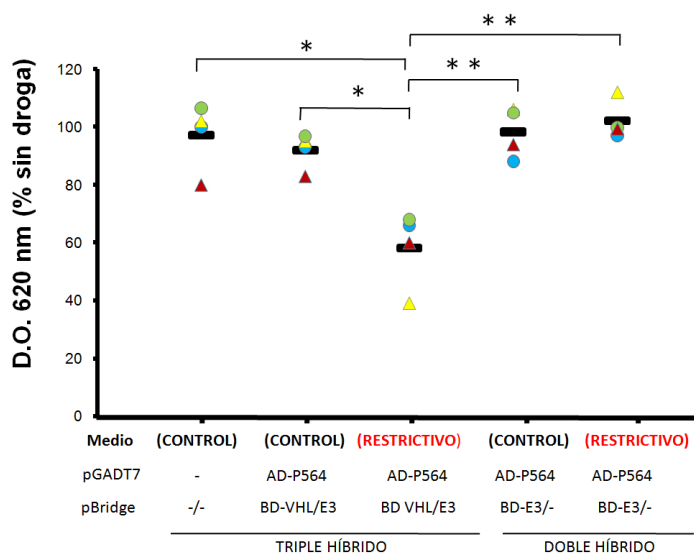


Figura 25. Efecto del DMOG en la unión directa de EGLN a HIF. Los clones de levaduras transformados con los plásmidos pGAD y pBridge vacíos (Sistema Vacío) o con construcciones codificantes para AD-HIFP564 y E3/BD-VHL (Sistema triple híbrido, VHL/HIF) ó DB-E3 (Sistema doble híbrido) se utilizaron para inocular medio sin Leu ni Trp (CONTROL) o medio carente de Leu, Trp, e His y Adenina (RESTRICTIVO). Los cultivos se crecieron en ausencia de droga o en presencia de DMOG 500 μ M, la densidad de los cultivos se determinó 16-24 horas tras la inoculación. Los valores de densidad obtenidos para los cultivos tratados con DMOG se normalizaron como porcentaje de absorbancia obtenida para cultivos en ausencia de droga. El gráfico representa los valores individuales de densidad para cada uno de los cuatro experimentos independientes. Las barras horizontales representan la media de los cuatro experimentos. Los distintos valores de media estadísticamente significativos están indicados con uno ($p < 0.05$) o dos asteriscos ($p < 0.01$).

El compuesto S956711 es una molécula perteneciente a una familia derivada del ácido 2-carbonico 3-hidroxiquinolina. En estudios realizados con esta molécula, se puso de manifiesto su capacidad para inhibir la interacción HIF- α /VHL, para estabilizar HIF- α y para inducir genes diana de HIF y angiogénesis en un modelo en rata [123]. A diferencia que el DMOG, el S956711 no presenta analogía con el 2- oxoglutarato y hasta la fecha no se ha elucidado su mecanismo de acción como inhibidor de la actividad EGLN. En nuestros ensayos de triple híbrido, habíamos comprobado el efecto de esta molécula sobre la actividad prolil hidroxilasa y/o interacción HIF-VHL. Quisimos comprobar el efecto del S956711 en la unión de EGLN3 a HIF utilizando el sistema doble híbrido detallado en la Figura 23.

A diferencia de lo observado para DMOG, el compuesto S956711 afecta específicamente a la interacción entre EGLN3 y HIF (Figura 26). Sin embargo, el efecto se observa sólo a dosis superiores a 50 μ M, mientras que el efecto de esta droga sobre el sistema del triple híbrido era significativo y específico desde 25 μ M (Figura 18). Además, la inhibición del crecimiento con S956711 a 50 μ M era del 60% en el caso del triple híbrido mientras que apenas supera el 20% en el sistema doble híbrido. Por lo tanto, el análisis cuantitativo de ambos ensayos revela que el S956711 tiene un mecanismo de acción diferente al DMOG y complejo.

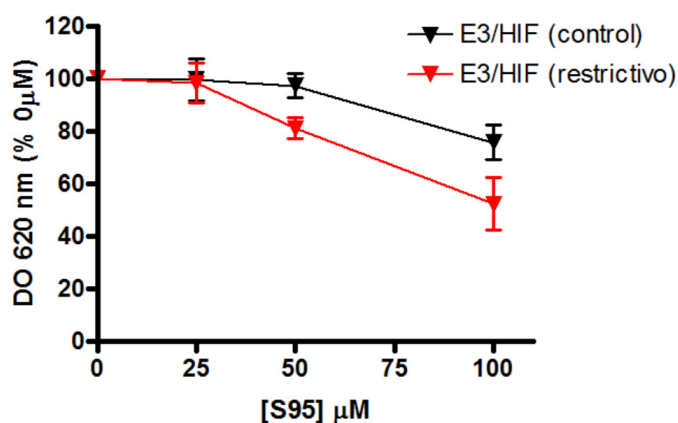


Figura 26. Efecto del S956711 en la unión directa de EGLN a HIF. Las levaduras transformadas con las construcciones que codifican para AD-HIFP564 y BD-EGLN3 (E3/HIF) sin Leu ni Trp (control) o medio restrictivo (restrictivo) carente de Leu, Trp, His y Adenina). Los cultivos celulares se crecieron en presencia de S956711 0, 50 o 100 μ M. La densidad óptica de los cultivos se determinó a las 14-20 horas tras la inoculación. La densidad celular (absorbancia a 620 nm) de cada cultivo se representa como el porcentaje de densidad respecto a las células crecidas en ausencia de droga. Las barras de error representan el error estándar de la media. El gráfico representa el valor promedio de tres experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 26, a dosis elevadas de S956711 (100 μ M) se hace patente cierto efecto tóxico de la droga, que inhibe el crecimiento de las levaduras en medio control hasta un 20%. A pesar de este efecto tóxico a dosis elevadas, que ya se había puesto de manifiesto en el sistema triple híbrido (Figura 18), seguimos observando una disminución específica en el crecimiento de las levaduras en medio restrictivo respecto al medio control (Figura 26).

Así, la combinación de los sistemas doble y triple híbrido nos ha permitido profundizar en el mecanismo de reacción de dos inhibidores conocidos de las prolin hidroxilasas de HIF: el DMOG y el S956711. El DMOG no tiene ningún efecto sobre la unión de EGLN3 a HIF (Figura 25) pero sí sobre la actividad enzimática hidroxilasa (Figura 19), debido muy probablemente a la competición que ejerce por los sitios de unión al cosustrato 2-oxoglutarato en el centro activo del enzima. En cambio, el S956711 presenta un doble efecto inhibitorio sobre la actividad hidroxilasa de EGLN3 (Figura 18) y sobre la unión de esta enzima a su sustrato HIF (Figura 26).

Discusión

En este trabajo describimos un sistema basado en la técnica de triple híbrido en levaduras que reconstituye la regulación de HIF a través de la hidroxilación en prolina y posterior interacción con VHL (Resultados, apartado 1. Figuras 11, 12 y 13). Dicho sistema se fundamenta en la interacción entre un fragmento de 22 residuos derivado de HIF-1 α (que contiene una de las prolinas hidroxilables contenidas en el ODD de HIF) y el dominio beta de VHL (residuos 63-157). El fragmento de HIF-1 α puede sustituirse por la proteína completa sin afectar el comportamiento del sistema, excepto por una ligera reducción en la fuerza de interacción [60]. Sin embargo, no hemos podido expresar la proteína VHL completa en levadura, probablemente debido a un mal plegamiento del dominio alpha de VHL en ausencia de las elonguinas B y C [143, 144]. Con el fin de evitar problemas derivados del mal plegamiento de VHL, y puesto que sólo el dominio alpha, y no el beta, interacciona con las elonguinas [143], generamos una forma truncada de VHL que carece de este dominio. Este fragmento de VHL contiene un dominio beta intacto [45] que, en concordancia con nuestros resultados, es suficiente para unir HIF. Aunque la interacción de esta forma truncada de VHL con HIF es fuerte, no podemos descartar que su afinidad por HIF sea diferente a la del complejo VBC nativo. En este sentido, durante la realización de este trabajo, se publicó la reconstrucción de la maquinaria de regulación de HIF mediante doble híbrido en levaduras [86], que a diferencia de nuestro sistema expresa el complejo VBC nativo. Comparando ambos sistemas, podemos sugerir que el nuestro probablemente está compuesto por los mínimos elementos funcionales requeridos que permiten reconstituir la regulación de HIF- α .

Dada la relevancia de la hipoxia en numerosas patologías, la identificación de pequeñas moléculas con la capacidad de modular la actividad de HIF ha despertado gran interés. En el trabajo aquí presentado hemos demostrado que el ensayo triple híbrido puede usarse como una eficiente herramienta para identificar pequeñas moléculas que interfieran con la regulación de HIF. Además, al contrario que los ensayos enzimáticos disponibles, este sistema se podría adaptar a un formato de placas de 96 pocillos donde podría usarse para rastreo masivo de drogas. Uno de los inconvenientes que podría presentar nuestro sistema es el estrecho rango de tiempo en el que el crecimiento de las levaduras es lineal. En este sentido, para adaptar este sistema a rastreos masivos sería más apropiado medir la actividad β -galactosidasa. La cepa de levadura AH109 contiene el gen LacZ bajo el control de elementos de respuesta a Gal4, así la actividad β -galactosidasa proporcionaría una lectura de la fuerza con la que interaccionan las proteínas de fusión

del sistema. En nuestro estudio, no hemos utilizado la actividad β -galactosidasa como lectura de la interacción debido a la elevada dispersión observada entre experimentos preliminares (datos no mostrados). La utilización de estos ensayos de actividad para la realización de rastreos de drogas a gran escala requeriría una puesta a punto de este aspecto.

Puesto que el control (sistema dependiente de LCK) está basado en la misma metodología que el sistema de interés (dependiente de EGLN), la combinación de ambos sistemas constituye un ensayo apropiado para rastreos masivos, ya que permite discriminar aquellos inhibidores cuyo efecto es específico sobre el sistema dependiente de EGLN (S95 y DMOG, Figuras 18 y 19), de aquellos con un amplio rango de dianas como el cloruro de cobalto o la deferoxamina (Figura 17). A pesar de que tanto la deferoxamina como el cloruro de cobalto han sido y siguen siendo ampliamente utilizados para mimetizar hipoxia, un estudio reciente pone de manifiesto la ineficacia de estas drogas como inhibidores de las EGLNs *in vitro* [139], resultados que apoyan la falta de efecto significativo observado en nuestro sistema al tratar con estos compuestos. Concretamente, la falta de inhibición observada al tratar con deferoxamina (Figura 17) podría deberse a la inducción de una respuesta adaptativa en levaduras que aumentase la toma de hierro [145]. El caso de la 15d-PGJ₂ es más complejo (Figura 20). A diferencia que el S956711 o el DMOG (Figuras 18 y 19 respectivamente), la 15d-PGJ₂ parece aumentar la interacción entre las proteínas de fusión AD-SH2 y BD-ITAM, como muestra el mayor crecimiento de las levaduras transformadas con este sistema en medio astringente respecto al medio control. Aunque no tenemos una explicación para este fenómeno sobre el sistema control (dependiente de LCK), este resultado implica que el efecto inhibitorio de esta droga sobre el sistema de estudio EGLN3-HIF-VHL (Figura 20) no se debe a efectos inespecíficos sobre viabilidad celular, como muestra la disminución en el crecimiento de las levaduras transformadas con estas construcciones en medio restrictivo respecto al medio control. La 15d-PGJ₂, al ser una molécula capaz de reaccionar con tioles mediante adiciones nucleófilas [142], presenta un gran número de dianas potenciales. Así, esta molécula podría estar actuando sobre cualquiera de las proteínas de los sistemas triple híbrido dependientes de EGLN3 y LCK induciendo un cambio en la actividad de los enzimas y/o un cambio conformacional en alguno de los componentes traduciéndose en un efecto diferencial en ambos sistemas. En concreto, el efecto sobre el sistema EGLN3-HIF-VHL podría explicarse por la oxidación del Fe²⁺ del

centro activo de EGLN3 a Fe^{3+} . Este resultado no hace sino validar la fiabilidad de nuestro sistema para detectar moléculas específicas y poco promiscuas, ya que aquellas drogas cuya única diana pertenezca al sistema de estudio, no deberían modificar el crecimiento del sistema control.

Finalmente, la comparación de los efectos de la droga en el sistema triple híbrido (interacción HIF/VHL mediada por EGLN3) y en la interacción directa entre HIF y las EGLNs (ensayo doble híbrido) podría ayudar a elucidar el mecanismo de inhibición de las drogas candidatas (Figura 23). Por otro lado, sería interesante realizar los rastreos con las tres isoformas EGLN1, EGLN2 y EGLN3. Aunque en este estudio nos hemos centrado en la isoforma EGLN3 para simplificar la puesta a punto del sistema, un rastreo en sistemas triple híbrido que expresen AD-HIF, BD-VHL y EGLN1 o EGLN2 o EGLN3 en paralelo, permitiría identificar moduladores específicos para una isoforma concreta. En este sentido, se ha visto que la región de las EGLNs responsable del reconocimiento de sustrato (HIF) se encuentra bastante alejada del centro activo del enzima y presenta mucha menor homología que éste entre las tres isoformas [89]. Por esta razón, cabe hipotetizar que los inhibidores específicos de una isoforma concreta interferirían preferentemente en la unión de la EGLN a su sustrato en vez de inhibir la actividad del enzima. El sistema doble híbrido AD-HIF y BD-EGLN ayudaría a identificar tales inhibidores.

En relación al estudio del mecanismo de acción de las drogas empleadas en este trabajo, los datos obtenidos con el compuesto S956711 (Figuras 18 y 26) indican claramente que el mecanismo de acción es distinto al de DMOG (Figuras 19 y 25). Como se comentó anteriormente, a diferencia del DMOG, el S956711 afecta específicamente a la interacción entre EGLN3 y HIF, pero sólo a dosis superiores a $50 \mu\text{M}$ (Figura 26). Por otro lado, el efecto de S956711 sobre el sistema del triple híbrido era significativo y específico desde $25 \mu\text{M}$. Además, la inhibición del crecimiento con S956711 $50 \mu\text{M}$ era del 60% en el caso del triple híbrido mientras que apenas supera el 20% en el sistema doble híbrido. En vista de estos resultados, caben dos posibles interpretaciones: (i) El efecto del S956711 no es sólo debido a una inhibición de la interacción de EGLN3 con su sustrato HIF, pues a bajas dosis ($25 \mu\text{M}$) se ve efecto en triple híbrido pero no en doble híbrido. Según esta hipótesis, el efecto del S956711 tendría lugar a 2 niveles: inhibición de la actividad enzimática (o interacción con vhl) e inhibición de la interacción con el sustrato. (ii) Podría suceder que el S956711 sólo esté inhibiendo la interacción entre

enzima y sustrato. El hecho de que no se vea efecto en doble híbrido a bajas dosis (Figura 26) puede deberse a que la expresión de EGLN3 desde el promotor P_{ADHI} en doble híbrido sea más fuerte que desde el promotor P_{Met25} en triple híbrido (Materiales y Métodos, apartado 3, Figura 7), en cuyo caso se requeriría una dosis de S956711 más alta para conseguir una inhibición en el sistema doble híbrido equivalente a la observada en triple híbrido. Puesto que la segunda posibilidad implica un modelo de acción más simple, nos inclinamos a favor de esta última. Se requiere trabajo adicional para poder validarla. En resumen, gracias a este sistema podemos concluir que el mecanismo de acción de S956711 (atendiendo a cualquiera de las dos posibilidades) es diferente al de DMOG, y proponer mecanismos de acción para el primero.

Finalmente, el ensayo no sólo nos permite identificar inhibidores de la ruta de HIF, sino también activadores de la misma (Figura 21). En el caso del R59949, a pesar del elevado efecto tóxico sobre el crecimiento, observamos un aumento significativo del crecimiento de las levaduras crecidas en medio restrictivo respecto a las crecidas en medio control. Además, este aumento es específico del sistema dependiente de EGLN3 puesto que no se observa tal efecto en el sistema control dependiente de LCK (Figura 21). Además, el efecto del R59949 sobre la interacción AD-HIF y BD-EGLN3 (sistema doble híbrido) presenta un perfil muy similar al observado en triple híbrido (datos no mostrados) lo que estaría indicando un potencial efecto de esta droga sobre la unión de EGLN3 a su sustrato HIF.

Por otro lado, se podría generar un sistema análogo al presentado en este trabajo para encontrar drogas que modulen la actividad de HIF en lugar de su estabilidad. Como se señaló en la introducción (Apartado 4), otra hidroxilasa de HIF, la enzima FIH, está implicada en la regulación de la actividad transcripcional de HIF mediante la hidroxilación en un residuo de asparagina (N803 en HIF-1 α humano) en el dominio de transactivación C-terminal. Esta hidroxilación impide la interacción de HIF con el coactivador p300 modulándose así la transcripción de ciertos genes dianas de HIF [32, 146]. Utilizando el mismo abordaje que el empleado en este estudio para EGLN3, podríamos generar un sistema que identificara inhibidores específicos de FIH. Como se muestra en la Figura 26, la interacción entre las proteínas de fusión AD-HIF y BD-p300 no tendría lugar en condiciones basales en las que FIH estaría hidroxilando AD-HIF. En estas condiciones no se observaría crecimiento de las levaduras en medio restrictivo. Una droga capaz de interferir con la actividad hidroxilasa y/o con la unión de FIH a su

sustrato, impediría la hidroxilación en la asparagina de HIF y por tanto permitiría el crecimiento de las levaduras.

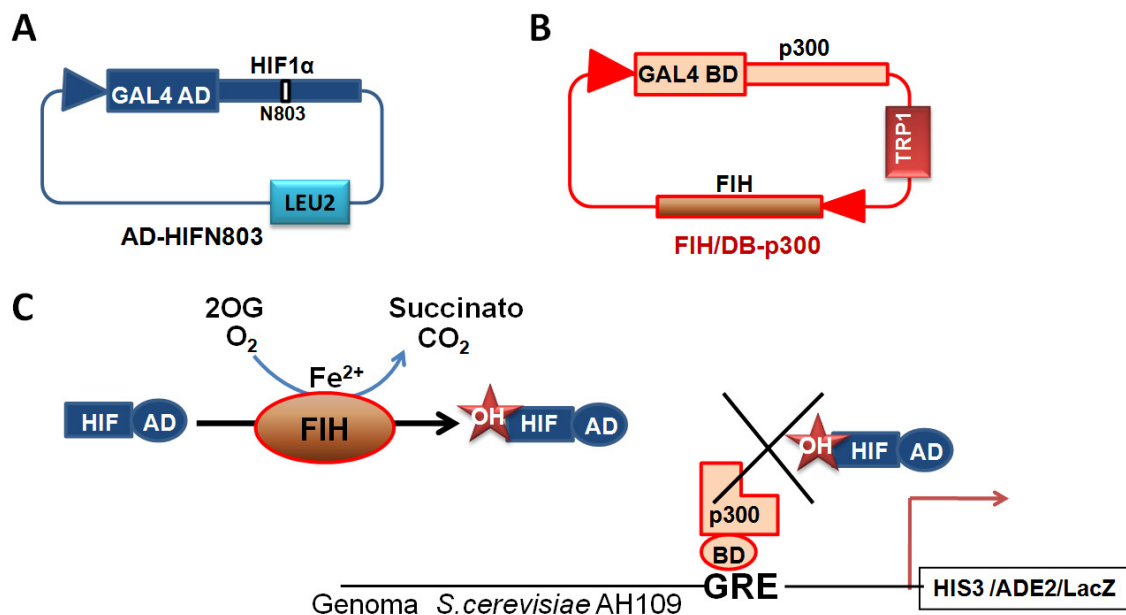


Figura 26. Sistema que reconstituye la hidroxilación del C-TAD de HIF por FIH e impide la unión al coactivador p300. A, plásmido que codifica para el fragmento de HIF que contiene la asparagina N803 hidroxilable fusionado al dominio de activación de Gal4. B, plásmido que codifica para p300 fusionado al dominio de unión a DNA de GAL4 y para la enzima FIH. C, Esquema de la reacción de hidroxilación catalizada por FIH que impide la interacción entre AD-HIF y BD-p300. Véase la analogía con el sistema triple híbrido utilizado en este estudio (figura 1).

En este sistema, observaríamos el efecto opuesto al sistema EGLN3/BD-VHL AD-HIF ya que un inhibidor de la actividad FIH tendría como consecuencia un aumento en el crecimiento de las levaduras. Además, y teniendo en cuenta la misma naturaleza hidroxilasa dependiente de Fe²⁺, 2-OG y oxígeno molecular de las EGLNs y FIH, una molécula que inhibiera dicha actividad hidroxilasa de forma genérica afectaría a ambos sistemas basados en EGLN o FIH.

De forma adicional, nuestro ensayo podría utilizarse para identificar pequeñas moléculas capaces de modificar la interacción entre formas mutantes de VHL y/o EGLN causantes de patologías, rescatando así la pérdida de función de estas proteínas en diversas patologías.

Por otro lado, el sistema E3/HIF/VHL descrito en este trabajo conserva fielmente la especificidad de sustrato de las EGLNs (Figura 14), lo que le confiere gran relevancia

bioquímica. De hecho, un trabajo llevado a cabo en nuestro grupo se apoya en esta herramienta para identificar la región responsable de conferir especificidad de sustrato a EGLN1 y EGLN3 [89]. Mediante un abordaje con proteínas quiméricas intercambiando el dominio catalítico y amino terminal de una y otra enzima, identificamos el motivo en EGLN1 responsable del reconocimiento del N-ODD de HIF, el cual no es reconocido por EGLN3. En otro estudio realizado también por nuestro grupo, esta herramienta doble híbrido es utilizada para identificar los residuos críticos de HIF-1 α necesarios para el reconocimiento por parte de EGLN1 y EGLN2. En este sentido, el formato en medio líquido desarrollado para esta tesis permitiría evaluar de forma cuantificable la interacción entre VHL y HIF1/2 α o entre EGLN y HIF en los diferentes mutantes.

Por último, el sistema aquí descrito conforma una herramienta ideal para la identificación de nuevos sustratos de las EGLNs y/o VHL. Como ya se ha mencionado, durante la preparación de nuestro trabajo, Bex y colaboradores identificaron mediante esta herramienta en levaduras una nueva diana de pVHL, la DGKi [86]. En esta isoforma identifican un motivo LXXLAP, susceptible de hidroxilación por las EGLNs, que no está presente en otras isoformas. La relevancia funcional de esta interacción deberá esclarecerse en el futuro.

En este sentido, en nuestro laboratorio hemos usado los sistemas doble y triple híbrido descritos en este trabajo para la búsqueda de nuevos sustratos de las EGLNs y/o VHL (datos no mostrados). En nuestro grupo, se han hecho rastreos en los sistemas doble y triple híbrido enfrentando las proteínas fusionadas al GAL4-BD a librerías de cDNAs fusionadas a GAL4-AD. En estos ensayos, hemos encontrado tanto sustratos conocidos como HIF-2 α como otros posibles candidatos cuya fidelidad está pendiente de evaluar en la actualidad (datos no mostrados). Este es un tema que despierta gran interés en el campo ya que en los últimos años se están empezando a descubrir nuevas posibles dianas de las EGLNs, lo que daría a estas enzimas mayor protagonismo en respuestas celulares distintas de la hipoxia.

Conclusiones

1. Hemos generado un sistema triple híbrido en levaduras HIF-VHL-EGLN que reconstituye fielmente la regulación de HIF en un contexto celular por la acción secuencial de las enzimas EGLN y posterior unión a VHL.
2. En nuestro sistema, el dominio β de VHL es suficiente para el reconocimiento y unión a HIF.
3. Hemos demostrado, mediante el empleo de inhibidores previamente caracterizados, la validez de nuestro sistema como herramienta de búsqueda de moléculas moduladoras de la actividad EGLN y/o la unión de HIF a VHL. El sistema es capaz de detectar tanto activadores como inhibidores.
4. El sistema triple híbrido HIF-VHL/EGLN en combinación con el sistema doble híbrido HIF-EGLN, permite profundizar en el mecanismo de acción de las moléculas moduladoras de la actividad EGLN.
5. Este modelo en levaduras, permite el estudio de la bioquímica del sistema HIF-VHL/EGLN.
6. Además, este sistema constituye una herramienta para la identificación de potenciales nuevos sustratos de VHL y/o EGLN3.

Bibliografía

1. Webster KA: **Hypoxia: life on the edge.** *Antioxid Redox Signal* 2007, **9**:1303-1307.
2. Rolfe DF, Brown GC: **Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals.** *Physiol Rev* 1997, **77**:731-758.
3. Prabhakar NR: **O₂ sensing at the mammalian carotid body: why multiple O₂ sensors and multiple transmitters?** *Exp Physiol* 2006, **91**:17-23.
4. Kemp PJ, Peers C: **Oxygen sensing by ion channels.** *Essays Biochem* 2007, **43**:77-90.
5. Kenneth NS, Rocha S: **Regulation of gene expression by hypoxia.** *Biochem J* 2008, **414**:19-29.
6. Taylor CT: **Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway.** *Biochem J* 2008, **409**:19-26.
7. Schofield CJ, Ratcliffe PJ: **Oxygen sensing by HIF hydroxylases.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**:343-354.
8. Mole DR, Ratcliffe PJ: **Cellular oxygen sensing in health and disease.** *Pediatr Nephrol* 2008, **23**:681-694.
9. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J: **Hypoxia signalling controls metabolic demand.** *Curr Opin Cell Biol* 2007, **19**:223-229.
10. Aragonés J, Fraisl P, Baes M, Carmeliet P: **Oxygen sensors at the crossroad of metabolism.** *Cell Metab* 2009, **9**:11-22.
11. Gamaley IA, Klyubin IV: **Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions.** *Int Rev Cytol* 1999, **188**:203-255.
12. Sies H, de Groot H: **Role of reactive oxygen species in cell toxicity.** *Toxicol Lett* 1992, **64-65 Spec No**:547-551.
13. Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL: **HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells.** *Cell* 2007, **129**:111-122.
14. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV: **HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia.** *Cell Metab* 2006, **3**:177-185.
15. Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, et al: **Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1^{-/-} mice.** *Nat Genet* 2003, **35**:331-340.
16. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: **Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:5510-5514.
17. Wang GL, Semenza GL: **Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1.** *J Biol Chem* 1995, **270**:1230-1237.
18. Semenza GL: **Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1.** *Biochem J* 2007, **405**:1-9.
19. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G: **Integration of oxygen signaling at the consensus HRE.** *Sci STKE* 2005, **2005**:re12.
20. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L: **Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression.** *Nature* 2001, **414**:550-554.

21. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M: **Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex.** *J Biol Chem* 2003, **278**:11032-11040.
22. Compennolle V, Brusselmans K, Franco D, Moorman A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P: **Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha.** *Cardiovasc Res* 2003, **60**:569-579.
23. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL: **Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha.** *Genes Dev* 1998, **12**:149-162.
24. Ryan HE, Lo J, Johnson RS: **HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization.** *EMBO J* 1998, **17**:3005-3015.
25. Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, Oktay Y, Bennett MJ, Bennett M, Shelton JM, Richardson JA, Moe O, Garcia JA: **HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner.** *Blood* 2005, **105**:3133-3140.
26. Semenza GL, Agani F, Iyer N, Kotch L, Laughner E, Leung S, Yu A: **Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1.** *Ann N Y Acad Sci* 1999, **874**:262-268.
27. Richardson VM, Santostefano MJ, Birnbaum LS: **Daily cycle of bHLH-PAS proteins, Ah receptor and Arnt, in multiple tissues of female Sprague-Dawley rats.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **252**:225-231.
28. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML: **Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch.** *Science* 2002, **295**:858-861.
29. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ: **The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.** *Nature* 1999, **399**:271-275.
30. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, et al: **Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation.** *Science* 2001, **292**:468-472.
31. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr.: **HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing.** *Science* 2001, **292**:464-468.
32. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK: **FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor.** *Genes Dev* 2002, **16**:1466-1471.
33. Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, et al: **Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family.** *J Biol Chem* 2002, **277**:26351-26355.
34. Taylor MS: **Characterization and comparative analysis of the EGLN gene family.** *Gene* 2001, **275**:125-132.
35. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ: **Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation.** *EMBO J* 2001, **20**:5197-5206.

36. Masson N, Ratcliffe PJ: **HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels.** *J Cell Sci* 2003, **116**:3041-3049.
37. Ehrismann D, Flashman E, Genn DN, Mathioudakis N, Hewitson KS, Ratcliffe PJ, Schofield CJ: **Studies on the activity of the hypoxia-inducible-factor hydroxylases using an oxygen consumption assay.** *Biochem J* 2007, **401**:227-234.
38. Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J: **Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases.** *J Biol Chem* 2004, **279**:9899-9904.
39. Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J: **Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications.** *Cell Signal* 2005, **17**:1-9.
40. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW: **Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation.** *Cell* 2002, **111**:709-720.
41. Ibrahim NO, Hahn T, Franke C, Stiehl DP, Wirthner R, Wenger RH, Katschinski DM: **Induction of the hypoxia-inducible factor system by low levels of heat shock protein 90 inhibitors.** *Cancer Res* 2005, **65**:11094-11100.
42. Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG, Jr.: **Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product.** *Nat Med* 1995, **1**:822-826.
43. Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG, Jr.: **pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:11661-11666.
44. Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS: **HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:9630-9635.
45. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY: **Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL.** *Nature* 2002, **417**:975-978.
46. Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Jr., Pavletich NP: **Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling.** *Science* 2002, **296**:1886-1889.
47. Kapitsinou PP, Haase VH: **The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice.** *Cell Death Differ* 2008, **15**:650-659.
48. Bishop T, Lau KW, Epstein AC, Kim SK, Jiang M, O'Rourke D, Pugh CW, Gleadle JM, Taylor MS, Hodgkin J, Ratcliffe PJ: **Genetic analysis of pathways regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor in *Caenorhabditis elegans*.** *PLoS Biol* 2004, **2**:e289.
49. Hoffman MA, Ohh M, Yang H, Klco JM, Ivan M, Kaelin WG, Jr.: **von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF.** *Hum Mol Genet* 2001, **10**:1019-1027.
50. Grosfeld A, Stolze IP, Cockman ME, Pugh CW, Edelmann M, Kessler B, Bullock AN, Ratcliffe PJ, Masson N: **Interaction of hydroxylated collagen IV with the von hippel-lindau tumor suppressor.** *J Biol Chem* 2007, **282**:13264-13269.
51. Kaelin WG: **The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: roles in cancer and oxygen sensing.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005, **70**:159-166.
52. Calzada MJ, Esteban MA, Feijoo-Cuaresma M, Castellanos MC, Naranjo-Suarez S, Temes E, Mendez F, Yanez-Mo M, Ohh M, Landazuri MO: **von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates the assembly of intercellular junctions in renal cancer**

- cells through hypoxia-inducible factor-independent mechanisms. *Cancer Res* 2006, **66**:1553-1560.**
53. Feijoo-Cuaresma M, Mendez F, Maqueda A, Esteban MA, Naranjo-Suarez S, Castellanos MC, del Cerro MH, Vazquez SN, Garcia-Pardo A, Landazuri MO, Calzada MJ: **Inadequate activation of the GTPase RhoA contributes to the lack of fibronectin matrix assembly in von Hippel-Lindau protein-defective renal cancer cells.** *J Biol Chem* 2008, **283**:24982-24990.
 54. Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Gavin BJ, Kley N, Kaelin WG, Jr., Iliopoulos O: **The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix.** *Mol Cell* 1998, **1**:959-968.
 55. Tang N, Mack F, Haase VH, Simon MC, Johnson RS: **pVHL function is essential for endothelial extracellular matrix deposition.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:2519-2530.
 56. Kuznetsova AV, Meller J, Schnell PO, Nash JA, Ignacak ML, Sanchez Y, Conaway JW, Conaway RC, Czyzyk-Krzeska MF: **von Hippel-Lindau protein binds hyperphosphorylated large subunit of RNA polymerase II through a proline hydroxylation motif and targets it for ubiquitination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:2706-2711.
 57. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzzen E, Wilson MI, Dhanda A, et al: **C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation.** *Cell* 2001, **107**:43-54.
 58. Bruick RK, McKnight SL: **A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF.** *Science* 2001, **294**:1337-1340.
 59. Koivunen P, Hirsila M, Kivirikko KI, Myllyharju J: **The length of peptide substrates has a marked effect on hydroxylation by the hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylases.** *J Biol Chem* 2006, **281**:28712-28720.
 60. Landazuri MO, Vara-Vega A, Viton M, Cuevas Y, del Peso L: **Analysis of HIF-prolyl hydroxylases binding to substrates.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **351**:313-320.
 61. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM: **Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor.** *J Biol Chem* 2004, **279**:38458-38465.
 62. Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J: **Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor.** *J Biol Chem* 2003, **278**:30772-30780.
 63. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J: **HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia.** *EMBO J* 2003, **22**:4082-4090.
 64. Schofield CJ, Ratcliffe PJ: **Signalling hypoxia by HIF hydroxylases.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **338**:617-626.
 65. Takeda K, Ho VC, Takeda H, Duan LJ, Nagy A, Fong GH: **Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:8336-8346.
 66. Percy MJ, Zhao Q, Flores A, Harrison C, Lappin TR, Maxwell PH, McMullin MF, Lee FS: **A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:654-659.

67. Percy MJ, Furlow PW, Beer PA, Lappin TR, McMullin MF, Lee FS: **A novel erythrocytosis-associated PHD2 mutation suggests the location of a HIF binding groove.** *Blood* 2007, **110**:2193-2196.
68. Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, Ni R, Taubman MB: **Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation.** *Biochem Cell Biol* 2002, **80**:421-426.
69. Mazzone M, Dettori D, Leite de Oliveira R, Loges S, Schmidt T, Jonckx B, Tian YM, Lanahan AA, Pollard P, Ruiz de Almodovar C, et al: **Heterozygous Deficiency of PHD2 Restores Tumor Oxygenation and Inhibits Metastasis via Endothelial Normalization.** *Cell* 2009, **136**:1-13.
70. Aragonés J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, Dirckx R, Zacchigna S, Lemieux H, Jeoung NH, et al: **Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism.** *Nat Genet* 2008, **40**:170-180.
71. Bishop T, Gallagher D, Pascual A, Lygate CA, de Bono JP, Nicholls LG, Ortega-Saenz P, Oster H, Wijeyekoon B, Sutherland AI, et al: **Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3^{-/-} mice.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**:3386-3400.
72. Berra E, Richard DE, Gothie E, Pouyssegur J: **HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation.** *FEBS Lett* 2001, **491**:85-90.
73. del Peso L, Castellanos MC, Temes E, Martín-Puig S, Cuevas Y, Olmos G, Landazuri MO: **The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen.** *J Biol Chem* 2003, **278**:48690-48695.
74. Metzén E, Stiehl DP, Doege K, Marxsen JH, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W: **Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element.** *Biochem J* 2005, **387**:711-717.
75. Pescador N, Cuevas Y, Naranjo S, Alcaide M, Villar D, Landazuri MO, Del Peso L: **Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene.** *Biochem J* 2005, **390**:189-197.
76. Ginouves A, Ilc K, Macias N, Pouyssegur J, Berra E: **PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:4745-4750.
77. Cervera AM, Apostolova N, Luna-Crespo F, Sanjuan-Pla A, Garcia-Bou R, McCreath KJ: **An alternatively spliced transcript of the PHD3 gene retains prolyl hydroxylase activity.** *Cancer Lett* 2006, **233**:131-138.
78. Berchner-Pfannschmidt U, Petrat F, Doege K, Trinidad B, Freitag P, Metzén E, de Groot H, Fandrey J: **Chelation of cellular calcium modulates hypoxia-inducible gene expression through activation of hypoxia-inducible factor-1alpha.** *J Biol Chem* 2004, **279**:44976-44986.
79. Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoumik A, Kadoya T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Frappell PB, et al: **Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia.** *Cell* 2004, **117**:941-952.
80. Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, Michelson KS, Gunzler V, Kondo K, Yang H, Sorokina I, Conaway RC, Conaway JW, Kaelin WG, Jr.: **Biochemical purification and**

- pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:13459-13464.
81. Masson N, Appelhoff RJ, Tuckerman JR, Tian YM, Demol H, Puype M, Vandekerckhove J, Ratcliffe PJ, Pugh CW: **The HIF prolyl hydroxylase PHD3 is a potential substrate of the TRiC chaperonin.** *FEBS Lett* 2004, **570**:166-170.
 82. Baek JH, Mahon PC, Oh J, Kelly B, Krishnamachary B, Pearson M, Chan DA, Giaccia AJ, Semenza GL: **OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha.** *Mol Cell* 2005, **17**:503-512.
 83. Ozer A, Wu LC, Bruick RK: **The candidate tumor suppressor ING4 represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:7481-7486.
 84. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, Taylor CT: **Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:18154-18159.
 85. Koditz J, Nesper J, Wottawa M, Stiehl DP, Camenisch G, Franke C, Myllyharju J, Wenger RH, Katschinski DM: **Oxygen-dependent ATF-4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor.** *Blood* 2007, **110**:3610-3617.
 86. Bex C, Knauth K, Dambacher S, Buchberger A: **A yeast two-hybrid system reconstituting substrate recognition of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:e142.
 87. Ding L, Traer E, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM: **The cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase, DGKiota.** *J Biol Chem* 1998, **273**:32746-32752.
 88. Li D, Hirsila M, Koivunen P, Brenner MC, Xu L, Yang C, Kivirikko KI, Myllyharju J: **Many amino acid substitutions in a hypoxia-inducible transcription factor (HIF)-1alpha-like peptide cause only minor changes in its hydroxylation by the HIF prolyl 4-hydroxylases: substitution of 3,4-dehydroproline or azetidine-2-carboxylic acid for the proline leads to a high rate of uncoupled 2-oxoglutarate decarboxylation.** *J Biol Chem* 2004, **279**:55051-55059.
 89. Villar D, Vara-Vega A, Landazuri MO, Del Peso L: **Identification of a region on hypoxia-inducible-factor prolyl 4-hydroxylases that determines their specificity for the oxygen degradation domains.** *Biochem J* 2007, **408**:231-240.
 90. Flashman E, Bagg EA, Chowdhury R, Mecinovic J, Loenarz C, McDonough MA, Hewitson KS, Schofield CJ: **Kinetic rationale for selectivity toward N- and C-terminal oxygen-dependent degradation domain substrates mediated by a loop region of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases.** *J Biol Chem* 2008, **283**:3808-3815.
 91. Kaelin WG: **Proline hydroxylation and gene expression.** *Annu Rev Biochem* 2005, **74**:115-128.
 92. Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouyssegur J, Yaniv M, Mechta-Grigoriou F: **JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress.** *Cell* 2004, **118**:781-794.
 93. Salnikow K, Su W, Blagosklonny MV, Costa M: **Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism.** *Cancer Res* 2000, **60**:3375-3378.

94. Martin F, Linden T, Katschinski DM, Oehme F, Flamme I, Mukhopadhyay CK, Eckhardt K, Troger J, Barth S, Camenisch G, Wenger RH: **Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation.** *Blood* 2005, **105**:4613-4619.
95. Chun YS, Choi E, Kim GT, Lee MJ, Lee SE, Kim MS, Park JW: **Zinc induces the accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, but inhibits the nuclear translocation of HIF-1beta, causing HIF-1 inactivation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **268**:652-656.
96. Hewitson KS, Lienard BM, McDonough MA, Clifton IJ, Butler D, Soares AS, Oldham NJ, McNeill LA, Schofield CJ: **Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates.** *J Biol Chem* 2007, **282**:3293-3301.
97. MacKenzie ED, Selak MA, Tennant DA, Payne LJ, Crosby S, Frederiksen CM, Watson DG, Gottlieb E: **Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**:3282-3289.
98. Gottlieb E, Tomlinson IP: **Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**:857-866.
99. Pollard PJ, Spencer-Dene B, Shukla D, Howarth K, Nye E, El-Bahrawy M, Deheragoda M, Joannou M, McDonald S, Martin A, et al: **Targeted inactivation of fh1 causes proliferative renal cyst development and activation of the hypoxia pathway.** *Cancer Cell* 2007, **11**:311-319.
100. Chan DA, Sutphin PD, Denko NC, Giaccia AJ: **Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1alpha.** *J Biol Chem* 2002, **277**:40112-40117.
101. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, et al: **Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression.** *Genes Dev* 2000, **14**:391-396.
102. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A: **Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha.** *Genes Dev* 2000, **14**:34-44.
103. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL: **Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells.** *J Biol Chem* 2002, **277**:38205-38211.
104. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL: **HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:3995-4004.
105. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL: **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* 2000, **60**:1541-1545.
106. Semenza GL: **Targeting HIF-1 for cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:721-732.
107. Alvarez-Tejado M, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, Landazuri MO, del Peso L: **Lack of evidence for the involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the**

- activation of hypoxia-inducible factors by low oxygen tension. *J Biol Chem* 2002, **277**:13508-13517.**
108. Arsham AM, Plas DR, Thompson CB, Simon MC: **Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 alpha nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription.** *J Biol Chem* 2002, **277**:15162-15170.
109. Melillo G: **HIF-1: a target for cancer, ischemia and inflammation--too good to be true?** *Cell Cycle* 2004, **3**:154-155.
110. Siddiq A, Aminova LR, Ratan RR: **Prolyl 4-hydroxylase activity-responsive transcription factors: from hydroxylation to gene expression and neuroprotection.** *Front Biosci* 2008, **13**:2875-2887.
111. Siddiq A, Ayoub IA, Chavez JC, Aminova L, Shah S, LaManna JC, Patton SM, Connor JR, Cherny RA, Volitakis I, et al: **Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition. A target for neuroprotection in the central nervous system.** *J Biol Chem* 2005, **280**:41732-41743.
112. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grunler J, Lindberg S, Pereira T, Yla-Herttuala S, Poellinger L, Brismar K, Catrina SB: **Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:19426-19431.
113. Gatenby RA, Gillies RJ: **Why do cancers have high aerobic glycolysis?** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:891-899.
114. Harris AL: **Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:38-47.
115. Hewitson KS, Schofield CJ: **The HIF pathway as a therapeutic target.** *Drug Discov Today* 2004, **9**:704-711.
116. Hewitson KS, McNeill LA, Schofield CJ: **Modulating the hypoxia-inducible factor signaling pathway: applications from cardiovascular disease to cancer.** *Curr Pharm Des* 2004, **10**:821-833.
117. Kolar F, Ostadal B: **Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia.** *Physiol Res* 2004, **53 Suppl 1**:S3-13.
118. Kung AL, Zabludoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, Cornell-Kennon S, Lee J, Wang B, Wang J, et al: **Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway.** *Cancer Cell* 2004, **6**:33-43.
119. Temes E, Martin-Puig S, Acosta-Iborra B, Castellanos MC, Feijoo-Cuaresma M, Olmos G, Aragonés J, Landazuri MO: **Activation of HIF-prolyl hydroxylases by R59949, an inhibitor of the diacylglycerol kinase.** *J Biol Chem* 2005, **280**:24238-24244.
120. Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, Fisher RJ, Shoemaker RH, Melillo G: **Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity.** *Cancer Res* 2005, **65**:9047-9055.
121. Rapisarda A, Uranchimeg B, Sordet O, Pommier Y, Shoemaker RH, Melillo G: **Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications.** *Cancer Res* 2004, **64**:1475-1482.
122. Ratan RR, Siddiq A, Aminova L, Lange PS, Langley B, Ayoub I, Gensert J, Chavez J: **Translation of ischemic preconditioning to the patient: prolyl hydroxylase inhibition and hypoxia inducible factor-1 as novel targets for stroke therapy.** *Stroke* 2004, **35**:2687-2689.
123. Warnecke C, Griethe W, Weidemann A, Jurgensen JS, Willam C, Bachmann S, Ivashchenko Y, Wagner I, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU: **Activation of the hypoxia-**

- inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors.** *FASEB J* 2003, **17**:1186-1188.
124. Ivan M: **HIF-Prolyl hydroxylase inhibitors: from basic science to clinical trials.** *Medica- a Journal of Clinical Medicine* 2006, **1**:67-69.
125. Nangaku M, Izuhara Y, Takizawa S, Yamashita T, Fujii-Kuriyama Y, Ohneda O, Yamamoto M, van Ypersele de Strihou C, Hirayama N, Miyata T: **A novel class of prolyl hydroxylase inhibitors induces angiogenesis and exerts organ protection against ischemia.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**:2548-2554.
126. Mole DR, Schlemminger I, McNeill LA, Hewitson KS, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Schofield CJ: **2-oxoglutarate analogue inhibitors of HIF prolyl hydroxylase.** *Bioorg Med Chem Lett* 2003, **13**:2677-2680.
127. Cunliffe CJ, Franklin TJ, Hales NJ, Hill GB: **Novel inhibitors of prolyl 4-hydroxylase. 3. Inhibition by the substrate analogue N-oxaloglycine and its derivatives.** *J Med Chem* 1992, **35**:2652-2658.
128. Hewitson KS, Schofield CJ, Ratcliffe PJ: **Hypoxia-inducible factor prolyl-hydroxylase: purification and assays of PHD2.** *Methods Enzymol* 2007, **435**:25-42.
129. Wirthner R, Balamurugan K, Stiehl DP, Barth S, Spielmann P, Oehme F, Flamme I, Katschinski DM, Wenger RH, Camenisch G: **Determination and modulation of prolyl-4-hydroxylase domain oxygen sensor activity.** *Methods Enzymol* 2007, **435**:43-60.
130. Arquier N, Vigne P, Duplan E, Hsu T, Therond PP, Frelin C, D'Angelo G: **Analysis of the hypoxia-sensing pathway in Drosophila melanogaster.** *Biochem J* 2006, **393**:471-480.
131. Fields S, Song O: **A novel genetic system to detect protein-protein interactions.** *Nature* 1989, **340**:245-246.
132. Young K, Lin S, Sun L, Lee E, Modi M, Hellings S, Husbands M, Ozenberger B, Franco R: **Identification of a calcium channel modulator using a high throughput yeast two-hybrid screen.** *Nat Biotechnol* 1998, **16**:946-950.
133. Joshi PB, Hirst M, Malcolm T, Parent J, Mitchell D, Lund K, Sadowski I: **Identification of protein interaction antagonists using the repressed transactivator two-hybrid system.** *Biotechniques* 2007, **42**:635-644.
134. Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH: **Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells.** *Nucleic Acids Res* 1992, **20**:1425.
135. Chan DA, Sutphin PD, Yen SE, Giaccia AJ: **Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:6415-6426.
136. Kageyama Y, Koshiji M, To KK, Tian YM, Ratcliffe PJ, Huang LE: **Leu-574 of human HIF-1alpha is a molecular determinant of prolyl hydroxylation.** *FASEB J* 2004, **18**:1028-1030.
137. Huang LE, Pete EA, Schau M, Milligan J, Gu J: **Leu-574 of HIF-1alpha is essential for the von Hippel-Lindau (VHL)-mediated degradation pathway.** *J Biol Chem* 2002, **277**:41750-41755.
138. Osborne MA, Dalton S, Kochan JP: **The yeast tribrid system--genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactions.** *Biotechnology (N Y)* 1995, **13**:1474-1478.
139. Hirsila M, Koivunen P, Xu L, Seeley T, Kivirikko KI, Myllyharju J: **Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway.** *FASEB J* 2005, **19**:1308-1310.

140. Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS: **Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress.** *J Biol Chem* 2004, **279**:40337-40344.
141. Asikainen TM, Ahmad A, Schneider BK, Ho WB, Arend M, Brenner M, Gunzler V, White CW: **Stimulation of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and VEGF by prolyl 4-hydroxylase inhibition in human lung endothelial and epithelial cells.** *Free Radic Biol Med* 2005, **38**:1002-1013.
142. Olmos G, Conde I, Arenas I, Del Peso L, Castellanos C, Landazuri MO, Lucio-Cazana J: **Accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha through a novel electrophilic, thiol antioxidant-sensitive mechanism.** *Cell Signal* 2007, **19**:2098-2105.
143. Stebbins CE, Kaelin WG, Jr., Pavletich NP: **Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function.** *Science* 1999, **284**:455-461.
144. Tan S: **A modular polycistronic expression system for overexpressing protein complexes in Escherichia coli.** *Protein Expr Purif* 2001, **21**:224-234.
145. Yun CW, Ferea T, Rashford J, Ardon O, Brown PO, Botstein D, Kaplan J, Philpott CC: **Desferrioxamine-mediated iron uptake in Saccharomyces cerevisiae. Evidence for two pathways of iron uptake.** *J Biol Chem* 2000, **275**:10709-10715.
146. Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM: **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* 2006, **66**:3688-3698.

Publicaciones

El trabajo aquí presentado ha culminado en la siguiente publicación:

“A yeast three-hybrid system that reconstitutes mammalian hypoxia inducible factor regulatory machinery.” **Alcaide-German, M. L.**, A. Vara-Vega, García Fernández, L. F., Landazuri, M. O., del Peso, L. (2008). BMC Cell Biol **9**: 18.

Además, en el transcurso del período de tesis he participado en otros proyectos cuyos resultados han sido publicados:

“Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene.” N. Pescador, Y. Cuevas, S. Naranjo, **M. Alcaide**, D. Villar M.O. de Landazuri and L. del Peso Biochem J **390**(Pt 1): 189-97.

Research article

Open Access

A yeast three-hybrid system that reconstitutes mammalian hypoxia inducible factor regulatory machinery

Maria L Alcaide-German¹, Alicia Vara-Vega², Luis F Garcia-Fernandez³, Manuel O Landazuri² and Luis del Peso^{*1}

Address: ¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols', Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain, ²Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa-UAM, Diego de León, 62. 28006 Madrid, Spain and ³R&D Department, PharmaMar, S.A. PharmaMar, Avenida de los reyes, 1. E-28770 Colmenar Viejo, Spain

Email: Maria L Alcaide-German - malcaide@iib.uam.es; Alicia Vara-Vega - avara.hlpr@salud.madrid.org; Luis F Garcia-Fernandez - lfarcia@pharmamar.com; Manuel O Landazuri - mortiz.hlpr@salud.madrid.org; Luis del Peso* - lpeso@iib.uam.es

* Corresponding author

Published: 10 April 2008

Received: 17 January 2008

BMC Cell Biology 2008, 9:18 doi:10.1186/1471-2121-9-18

Accepted: 10 April 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/9/18>

© 2008 Alcaide-German et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Several human pathologies, including neoplasia and ischemic cardiovascular diseases, course with an unbalance between oxygen supply and demand (hypoxia). Cells within hypoxic regions respond with the induction of a specific genetic program, under the control of the Hypoxia Inducible Factor (HIF), that mediates their adaptation to the lack of oxygen. The activity of HIF is mainly regulated by the EGL-nine homolog (EGLN) enzymes that hydroxylate the alpha subunit of this transcription factor in an oxygen-dependent reaction. Hydroxylated HIF is then recognized and ubiquitinated by the product of the tumor suppressor gene, pVHL, leading to its proteosomal degradation. Under hypoxia, the hydroxylation of HIF by the EGLNs is compromised due to the lack of oxygen, which is a reaction cosubstrate. Thus, HIF escapes degradation and drives the transcription of its target genes. Since the progression of the aforementioned pathologies might be influenced by activation of HIF-target genes, development of small molecules with the ability to interfere with the HIF-regulatory machinery is of great interest.

Results: Herein we describe a yeast three-hybrid system that reconstitutes mammalian HIF regulation by the EGLNs and VHL. In this system, yeast growth, under specific nutrient restrictions, is driven by the interaction between the β domain of VHL and a hydroxyproline-containing HIF α peptide. In turn, this interaction is strictly dependent on EGLN activity that hydroxylates the HIF α peptide. Importantly, this system accurately preserves the specificity of the hydroxylation reaction toward specific substrates. We propose that this system, in combination with a matched control, can be used as a simple and inexpensive assay to identify molecules that specifically modulate EGLN activity. As a proof of principle we show that two known EGLN inhibitors, dimethyloxaloylglycine (DMOG) and 6-chlor-3-hydroxychinolin-2-carbonic acid-N-carboxymethylamide (S95671 I), have a profound and specific effect on the yeast HIF/EGLN/VHL system.

Conclusion: The system described in this work accurately reconstitutes HIF regulation while preserving EGLN substrate specificity. Thus, it is a valuable tool to study HIF regulation, and particularly EGLN biochemistry, in a cellular context. In addition, we demonstrate that this system can be used to identify specific inhibitors of the EGLN enzymes.

Background

Most mammalian tissues are strictly dependent on oxidative metabolism and require constant oxygen supply to maintain cell function. Thus, acute oxygen deprivation, even for brief periods of time, can be deleterious. In contrast, cells can adapt to moderate chronic hypoxia through the induction of a specific gene expression program. The induction of this set of genes adjusts the metabolism by increasing anaerobic glycolysis [1] and fine-tuning mitochondrial respiration [2,3]. In addition, hypoxic cells induce vascularization of the poorly oxygenated tissue through the expression of proangiogenic molecules such as VEGF [4]. The family of Hypoxia Inducible Factors (HIFs) is responsible for the induction of the vast majority of the genes involved in these adaptive responses [5,6]. HIF transcription factors are heterodimers of an oxygen dependent alpha subunit (HIF α) and a beta (HIF β) chain that is shared with other transcription factors of the basic-helix-loop-helix family. There are three different HIF α isoforms (HIF1 α , HIF 2 α and HIF 3 α), encoded by independent genes, whose regulation by oxygen is thought to be similar. Oxygen affects the half life [7,8] as well as the transcriptional activity [9] of HIF α proteins. In both cases, the effect is mediated by hydroxylation of specific residues, within HIF α , by a family of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases that require molecular oxygen as cosubstrate. These modifications affect the ability of HIF to interact with other proteins. Specifically, hydroxylation of a conserved asparagine residue (N803 in human HIF1 α protein) within the C-terminal transactivation domain by the Factor Inhibiting HIF (FIH) [10,11] prevents its interaction with the p300 coactivator [9]. On the other hand, the activity of the EGL-nine homologues (EGLNs, [12]) results in the hydroxylation of two conserved proline residues (P402 and P564 in human HIF1 α) within the Oxygen-Dependent Degradation domain (ODD) of HIF α proteins [13]. Proline hydroxylation allows the binding of the E3 ubiquitin ligase pVHL to HIF α leading to its ubiquitination and proteosomal degradation [8,14,15]. Since FIH and EGLNs require oxygen as cosubstrate, under hypoxia their activity is reduced [16,17]. As a consequence the interaction with pVHL is lost, leading to HIF stabilization, while the interaction with p300 is allowed resulting in enhanced transcriptional activity. Although the regulation of HIF transcriptional activity seems to be critical for the induction of some HIF-target genes during hypoxia [18], the major effect of oxygen is the regulation of HIF α stability through the activity of the EGLNs. To date three independent enzymes termed EGLN1, 2 and 3 (also known as PHD2, 1 and 3 respectively) have been described to mediate HIF α proline hydroxylation [7,19,20]. Intriguingly, these enzymes display substrate specificity: while EGLN1 and 2 are capable of hydroxylating both HIF α prolines, EGLN3 is unable to act upon the N-terminal residue (P402 in human HIF1 α) [17,21-23].

In this regard, recent publications describe novel potential targets for these enzymes that seem to be regulated by specific isoforms [24,25].

In addition to the relevance of this pathway in the physiological response to reduced oxygen supply, it probably plays a major role during the progression of several pathologies that course with hypoxia. Specifically, activation of HIF has been implicated in the induction of the glycolytic and angiogenic phenotype of cancer [4,26], generation and progression of tumors [27] and resistance to the ischemic insults (preconditioning) [28,29] among other phenomena. Thus, the identification of small molecules that modulate this pathway is of great therapeutical interest. In fact, several molecules with the ability to modulate HIF activity have been already described. In animal models, HIF inhibitors have been proven useful in the treatment of tumors [30], while molecules with the ability to induce HIF result in angiogenesis *in vivo* [31].

In this work, we describe the generation of a three-hybrid system that accurately reconstitutes mammalian HIF α regulation by EGLN hydroxylation and subsequent VHL binding. This system can be of aid in the study of EGLN biochemistry and the characterization of novel substrates. In addition, we demonstrate that it can be used as an efficient assay to screen for small molecules with the ability to regulate HIF.

Results

Generation of a yeast three hybrid-based system that reconstitutes HIF regulation

Several EGLN assays have been described which include the determination of enzyme activity by measure of cosubstrates (dioxygen and 2-oxoglutarate) consumption/CO₂ production and the detection of HIF hydroxylation using mass spectrometry or capture of VHL [32,33]. In addition, strategies to determine EGLN activity within cells have also been developed. These include the detection of reporter proteins fused to ODD [34] and the use of antibodies raised against hydroxyproline-containing ODDs [35]. The major limitation of the *in vitro* assays is that they are performed in a non physiological environment. On the other hand, the cell-based assays have to deal with the endogenous HIF machinery. To circumvent these problems we sought to reconstitute the HIF regulatory machinery in yeast cells, where expressed proteins are in a cellular environment but where no endogenous proteins related to the HIF pathway are expressed, therefore eliminating possible sources of interference. To this end, we cloned a fragment of human HIF1 α (residues 554–576) containing P564 in frame with yeast Gal4 activation domain (AD-P564) (figure 1A). This fragment is sufficient for EGLN recognition [23] and VHL binding [36]. In addition, we cloned a VHL fragment encoding for its β -domain

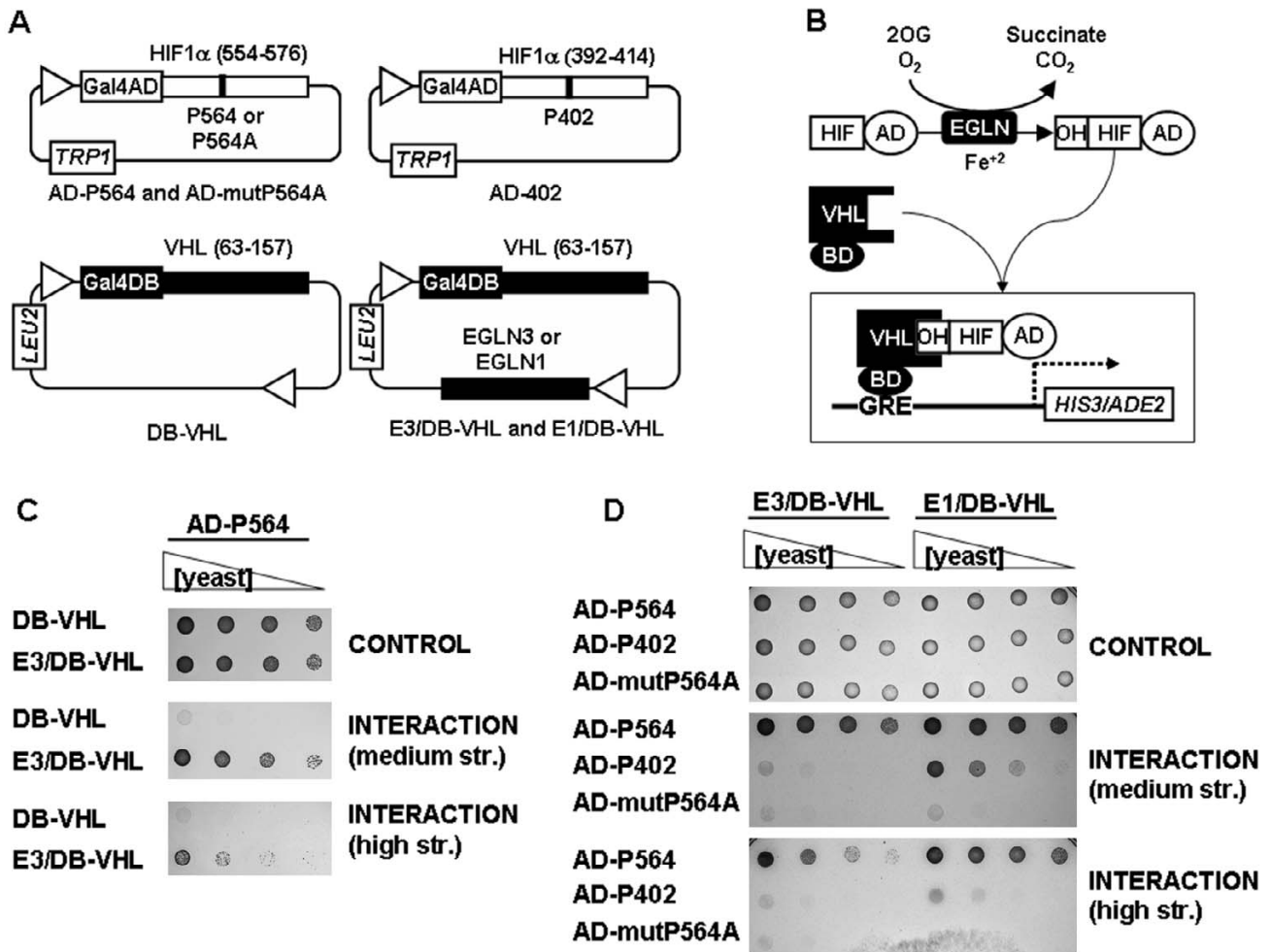


Figure 1
Characterization of a yeast three-hybrid system that reconstitutes HIF regulatory machinery. A, Schematic diagram representing the yeast three-hybrid constructs. Numbers in brackets correspond to residue positions for the encoded proteins. *TRP1* and *LEU2*, genes encoding for the enzymes that allow cell growth in the absence of Trp and Leu respectively. B, Schematic diagram of the interaction between the different system components. 2OG, 2-oxoglutarate. C and D, Serial dilutions of clones transformed with the indicated constructs were grown on plates lacking Leu and Trp (CONTROL), plates lacking Leu, Trp and His (INTERACTION, medium str.) or plates lacking Leu, Trp, His and adenine (INTERACTION, high str.). The results shown are representative of at least three independent experiments.

(residues 63 to 157) in frame with the yeast Gal4 DNA binding domain (DB-VHL) (figure 1A). The VHL β -domain is involved in HIF1 α binding, while the α -domain, missing in this construct, interacts with the elongins B/C that are required to promote HIF α ubiquitination. Then we tested the interaction between these fusion proteins as their ability to support the growth of a yeast strain conditionally auxotrophic for histidine and adenine (figure 1B). As shown in figure 1C, yeast cells transformed with AD-P564 in combination with DB-VHL failed to grow in plates lacking histidine, suggesting lack of significant interaction between the two fusion proteins.

This result was expected since no EGLN orthologs are present in yeast and VHL binding to HIF1 α is strictly dependent on proline hydroxylation [8,14]. In addition, these data indicates that residual binding of VHL to non-hydroxylated AD-P564 is below detection limit in our assay conditions. Importantly, the expression of EGLN3 (construct E3/DB-VHL, figure 1A), together with the two fusion proteins, is sufficient to promote direct binding of DB-VHL to AD-P564, as indicated by the growth of transformed yeast in restrictive plates (figure 1C). The effect was not restricted to EGLN3 since the expression of EGLN1 also triggered the interaction between the fusion

proteins (figure 1D). To further confirm that DB-VHL/AD-P564 interaction was mediated by the hydroxylation of AD-P564 by EGLNs, we repeated the experiment using a mutant HIF peptide in which P564 was replaced by an alanine residue (AD-mutP564A, figure 1A). As shown in figure 1D, DB-VHL was unable to interact with AD-mutP564A regardless of the presence of either EGLN. Moreover, in spite of relaxed target requirements [23,37], it has been described that EGLN isoforms display a specific preference for the two target sequences in HIF1 α [17,21-23]. Therefore, we next wanted to determine whether in this system the EGLNs retained their native substrate specificity. Figure 1D shows that EGLN3 efficiently hydroxylates the peptide containing the sequence surrounding proline 564 (AD-P564), but it has no detectable activity toward a peptide comprising residues 392–414 derived from HIF1 α (AD-P402). In contrast, EGLN1 was able to hydroxylate both sequences allowing their binding to VHL (figure 1D). Interestingly, the activity of EGLN1 toward AD-P402 was slightly lower than its activity using AD-P564 substrate as evidenced by the different growth of yeast transformed with each sequence in the high stringency plates (figure 1D). These results are in perfect agreement with previous reports describing the activity of the EGLN isoforms against different substrates [23,37-39]. Finally, further confirmation that EGLNs retained their substrate specificity was obtained through the analysis of the effect of L574A and L562R mutations (Additional file 1).

All together, these results indicate that this system faithfully reconstitutes the regulation of HIF α proteins by the sequential action of EGLN enzymes and VHL binding. In addition, data show that the β -domain of VHL is sufficient for target recognition and binding.

The reconstituted HIF/EGLN/VHL system can be exploited to identify specific EGLN inhibitors

The system described above relies on EGLN activity for DB-VHL/AD-P564 interaction, thus we reasoned that EGLN inhibitors should interfere with yeast growth. However, in cell-based assays, the inhibitory effects of drugs have to be carefully controlled for unspecific side effects on cell physiology or on the assay system itself. In order to have a control for the drug specificity and rule out potential side effects on yeast growth, we generated a set of constructs analogous to those described above but based on a protein machinery unrelated to the HIF pathway. In this control system, yeast growth is dependent on the interaction between an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), derived from the type I γ IgE receptor (Fc ϵ RI γ), and the Src-Homology domain 2 (SH2) from the Syk protein. Importantly, the binding of Syk-SH2 tandem domains to the Fc ϵ RI γ -ITAM is dependent on the tyrosine phosphorylation of the latter [40]. The vectors

generated for this system (figure 2A) encode for a Syk-derived tandem SH2 domains fused to the activation domain of Gal4 (AD-SH2) and for an ITAM from Fc ϵ RI γ fused to the Gal4 DNA binding domain (DB-ITAM). Finally, the cytoplasmic tyrosine kinase Lck was cloned into the pBridge vector to induce DB-ITAM phosphorylation and trigger its binding to AD-SH2 (figure 2B). Since yeast do not contain orthologues of the proteins of this system, AD-SH2 did not significantly interact with DB-ITAM unless the tyrosine kinase Lck was co-expressed in the assay (figure 2C), as previously reported [40]. Thus, the Lck and EGLN-based assays are analogous in that both have three components: an enzyme and two fusion proteins whose interaction allows yeast growth in restrictive media. Additionally, in both systems the interaction between the fusion proteins, and thus yeast growth, requires a modification of one of these proteins by the enzyme (compare figures 1B and 2B).

Next we tested the ability of these combined systems to detect molecules that interfere with HIF regulation. For this purpose we selected two previously characterized EGLN inhibitors, dimethylxaloylglycine (DMOG) [41] and 6-chlor-3-hydroxyquinolin-2-carboxylic acid-N-carboxymethyl-amide (S956711) [31]. In order to facilitate the quantification of the effects of inhibitors on these systems, we set up the experiments in liquid media so that yeast growth could readily be determined by the optical density of the cell culture. Since the growth rate of yeast transformed with different constructs in each culture media varies, we adjusted the initial concentration of each yeast strain for each media so that all cultures achieved logarithmic growth in overlapping time windows (Additional file 2). As shown in figure 3A, treatment with increasing doses of S956711 had a strong effect on the growth of yeast expressing AD-HIF and DB-VHL/EGLN3 in restrictive media. In contrast, when these cells were cultured in control media, where no interaction between fusion proteins was required for growth, S956711 had only a minor effect when used at 100 μ M (figure 3A). Thus, the effect of S956711 is not due to an unspecific effect on yeast viability/growth. To further confirm the specificity of the effect upon the HIF system, we tested the effect of S956711 on yeast transformed with AD-SH2 and DB-ITAM/Lck. As shown in figure 3, S956711 had no significant effect in this control system regardless of the culture media. These results rule out that the inhibition of the EGLN system could be due to side effects of S956711 on transcription/translation of the three-hybrid elements. The specific inhibitory effect of S956711 was highly reproducible and unspecific effects were undetectable at doses below 100 μ M (figure 3B). Similarly to the results observed for S956711, treatment with DMOG also resulted in a dose-dependent inhibition of the interaction between AD-HIF and DB-VHL (figure 4A). As shown for

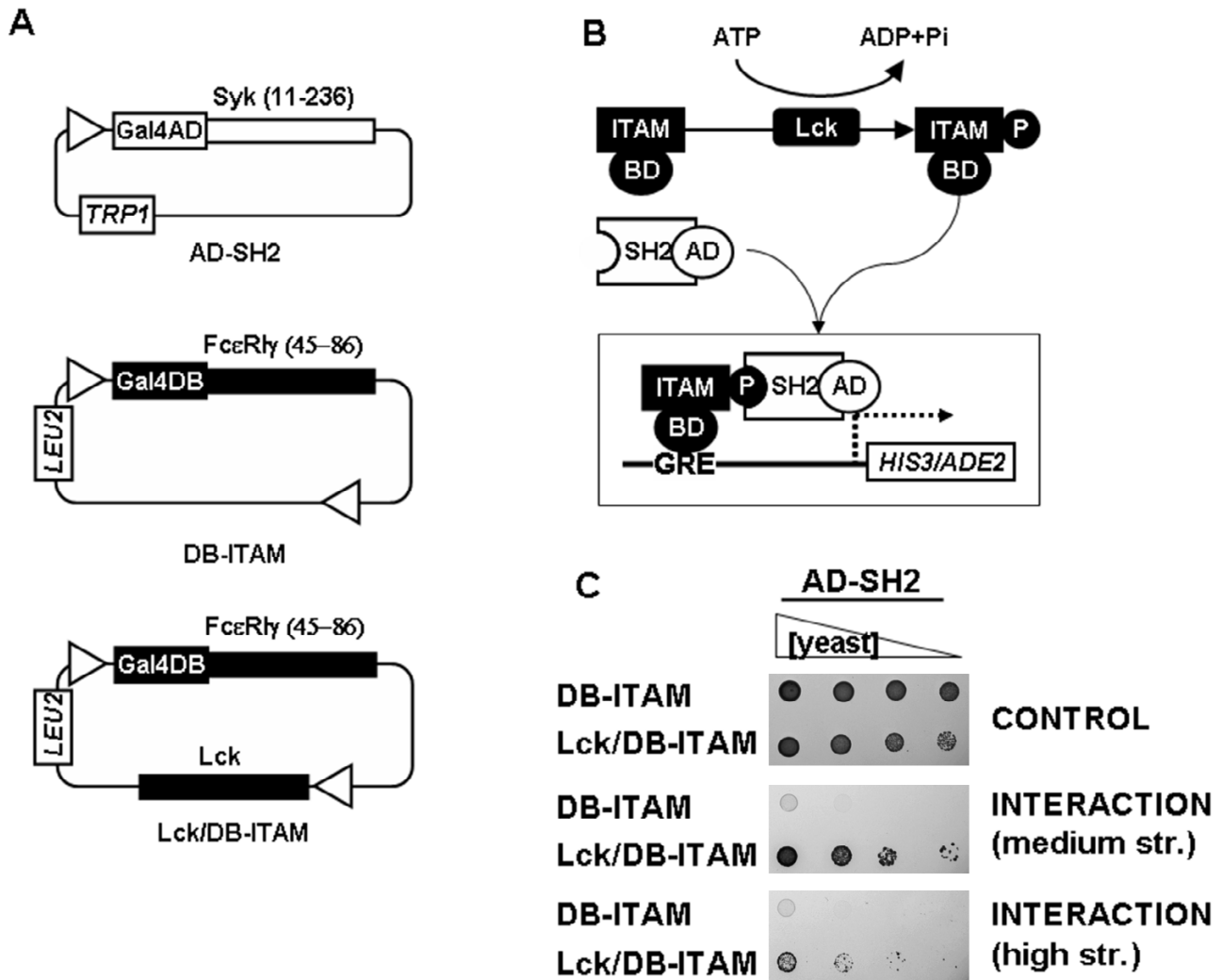


Figure 2
Characterization of a control yeast three-hybrid system based on an ITAM/SH2 interaction that depends on Lck activity. A, Schematic diagram representing the constructs. Abbreviations are as in figure 1. B, Schematic diagram of the interaction between the different system components. C, Serial dilutions of clones transformed with the indicated constructs were grown on different astringency plates. Symbols, abbreviations and panel labels are as in figure 1. The results shown are representative of at least three independent experiments.

S956711, DMOG inhibition was specific for the HIF regulatory machinery, since no effect was observed on the binding of AD-SH2 to DB-ITAM (figures 4A and 4B).

DMOG is a 2-oxoglutarate analogue that probably inhibits EGLN activity by competition with the reaction cosubstrate 2-oxoglutarate [42]. Thus, DMOG should affect EGLN catalytic activity (substrate hydroxylation), but not substrate binding. With the purpose of testing this hypothesis, we investigated the effect of DMOG on EGLN3 binding to HIF using a two hybrid-based assay [23]. In this assay, yeast growth in restrictive media is dependent on the direct interaction between a Gal-4 DNA

binding domain-EGLN3 (DB-E3) and AD-HIF fusion proteins (figures 5A and 5B). The interaction between DB-E3 and AD-HIF is specific since a single mutation on the target proline in HIF sequence abolishes yeast growth (figure 5C) [23]. Importantly, this assay allows the direct comparison of DMOG effect on EGLN3 ability to bind HIF and act upon it. As shown in figure 5D, DMOG treatment had no effect on the direct binding of EGLN3 to its substrate, as demonstrated by the lack of effect on the growth of yeast expressing DB-EGLN3 and AD-HIF (E3/HIF system). However, at the same doses it clearly affected the hydroxylation of AD-HIF by EGLN3 (figure 5D, VHL/HIF system). This result indicates that, as expected, DMOG does

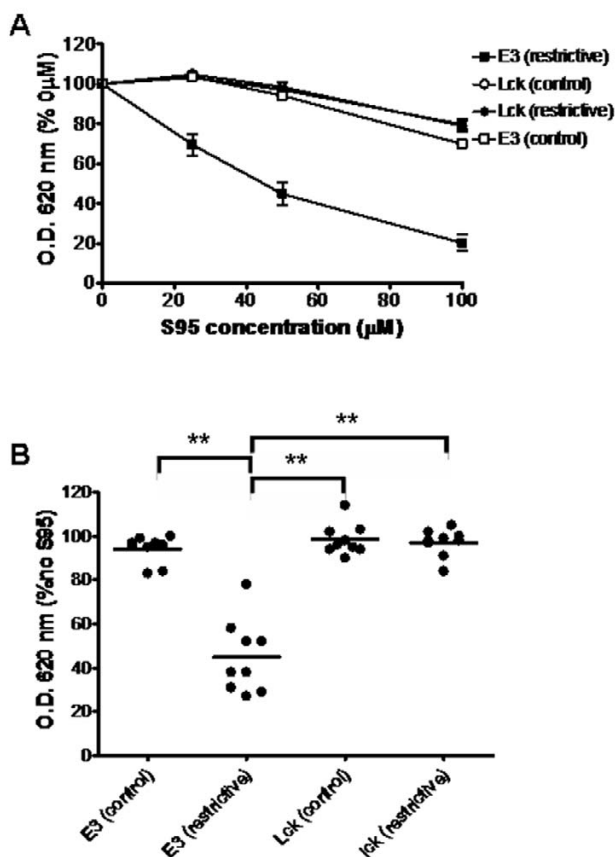


Figure 3
Effect of S956711 on the EGLN-dependent and Lck-dependent three-hybrid systems. Yeast clones transformed with constructs encoding for AD-P564 and E3/DB-VHL (E3) or AD-SH2 and Lck/DB-ITAM (Lck) were used to inoculate control media lacking Leu and Trp (control) or restrictive media (restrictive) lacking Leu, Trp, and His (in the case of E3 clones, restrictive media also lacked adenine). Duplicate cell cultures were grown in the presence of 0, 25, 50 or 100 µM S956711. The density of cultures was determined 16–24 hours after inoculation. A, The cell density (absorbance at 620 nm) of each culture condition is represented as the percentage of density obtained for the cells grown in the absence of drug. The graph represents the average values of nine independent experiments. Error bars represent the S.E.M. B, the individual data values of density for the 50 µM S956711 cultures in A are represented. Horizontal bars represent the mean. Statistically significant different mean values ($p < 0.001$) are indicated with asterisks.

not affect EGLN binding to substrate. Therefore, the effect of this drug on the reconstituted HIF system (figure 4) is likely due to its effect on EGLN activity rather than the EGLN3/HIF interaction. It should be noted however that these results do not exclude a potential effect of DMOG on VHL/hydroxylated-HIF interaction.

In addition to S956711 and DMOG, we also tested more general inhibitors, such as deferoxamine and cobalt chloride, that have been widely used to activate HIF [8,14]. EGLNs contain a tightly bound Fe^{+2} atom in the catalytic site that is required as a cofactor in the hydroxylation reaction. Consequently, iron sequestration by the chelating agent deferoxamine results in EGLN inhibition [8,14]. On the other hand, the mechanism of EGLN inhibition by cobalt chloride is controversial [43,44]. It might act by substitution of the iron from the enzyme catalytic site and/or interfere with ascorbate transport [44], which is required to prevent the oxidation of the catalytic site of the enzyme. In our assays, cobalt chloride had an important toxic effect on yeast and showed little specific inhibition of the EGLN system (data not shown), thus we did not study it in further detail. On the other hand, we were unable to detect any significant effect of deferoxamine on yeast growth at concentrations up to 1 mM (data not shown). A possible explanation for the lack of effect of deferoxamine is that treatment might induce an adaptive response in yeast that increases their iron uptake [45]. In spite of their wide use as hypoxia mimetics, a recent report describes that cobalt and deferoxamine are ineffective inhibitors of EGLNs in vitro [43], which is in agreement with the lack of significant effect of these drugs in our system.

All together these results indicate that the combination of the control (Lck-dependent) and experimental (EGLN-dependent) systems constitutes an efficient assay to identify small molecules that have a specific effect on EGLN activity, while revealing those that have unspecific or toxic effects. Importantly, the effect of S956711 and DMOG in our system was achieved at doses equivalent to those required for the inhibition of EGLNs in mammalian cells [31,41].

Discussion

Herein we describe a yeast three-hybrid system that reconstitutes HIF regulation through proline hydroxylation and VHL interaction. This system accurately preserves EGLN substrate specificity, supporting its biochemical relevance. The system described in this work relies on the interaction between a 22 residue fragment derived from HIF1 α and the β -domain of VHL. The HIF1 α fragment can be replaced by the full length protein without affecting the performance of system, except for a slight reduction in the interaction strength (data not shown). However, we were unable to express full length VHL in yeast (data not shown), probably due to misfolding of its α -domain in the absence of elongins B and C [46,47]. To circumvent this problem and since only the α domain of VHL interacts with elongin B [46], we generated a truncated VHL lacking this domain. This VHL form contains an intact β -domain [36] that, according to our data, is sufficient to

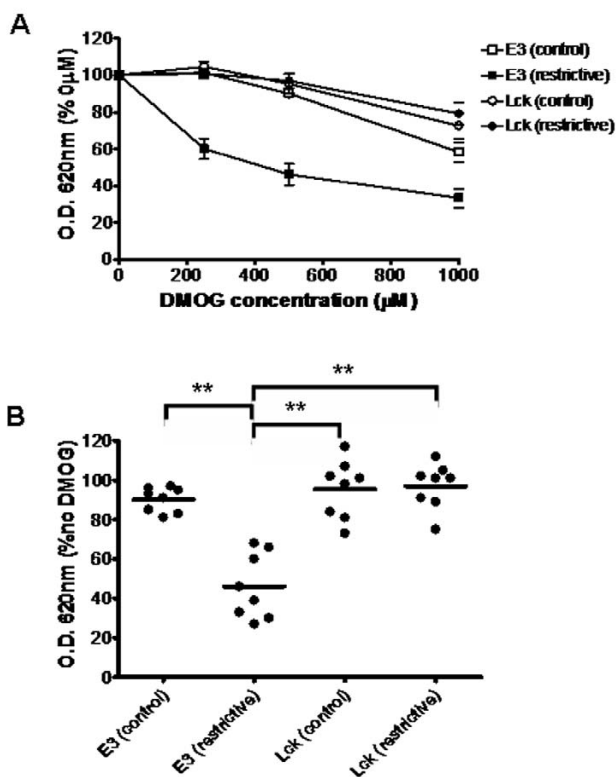


Figure 4
Effect of DMOG on the EGLN-dependent and Lck-dependent three-hybrid systems. Yeast clones transformed with constructs encoding for AD-P564 and E3/DB-VHL (E3) or AD-SH2 and Lck/DB-ITAM (Lck) were used to inoculate control media lacking Leu and Trp (control) or restrictive media (restrictive) lacking Leu, Trp, and His (in the case of E3, clones restrictive media also lacked adenine). Duplicate cell cultures were grown in the presence of 0, 250, 500 or 1000 μM DMOG. The density of cultures was determined 16–24 hours after inoculation. A, The cell density (absorbance at 620 nm) of each culture condition is represented as the percentage of density obtained for the cells grown in the absence of drug. The graph represents the average values of eight independent experiments. Error bars represent the S.E.M. B, the individual data values of density for the 500 μM DMOG cultures in A are represented. Horizontal bars represent the mean. Statistically significant different mean values ($p < 0.001$) are indicated with asterisks.

bind HIF. Although the interaction of this truncated VHL construct with HIF is robust, we can not rule out that its affinity for HIF is different to that of the native VBC complex. In summary, this system is probably composed of the minimal functional units required to reconstitute HIF1 α regulation.

Given the relevance of hypoxia in several pathologies, the identification of small molecules with the ability to mod-

ulate HIF activity has drawn much interest. In this regard, we have demonstrated that the three-hybrid assay described herein can be used to effectively identify small molecules that interfere with HIF regulation. Importantly, in contrast to current enzymatic assays, this system can be easily adapted to be performed on 96-well plates so it can be used for high-throughput screening of small molecules. In this regard, it should be noted that the direct determination of yeast growth provides a narrow linear range. Thus, in order to adapt this system to large high throughput screenings it would be much more convenient to determine β -galactosidase activity. Several yeast strains contain a *LacZ* gene under the control of the Gal4 promoter, thus β -galactosidase activity reflects the strength of the interaction between fusion proteins. In addition, the controls included in this work have proved useful in discriminating between genuine specific inhibitors of the EGLN-dependent system and molecules with a broad spectrum of targets such as cobalt chloride. Since the control (Lck-dependent assay) is based in exactly the same methodology than the test (EGLN-dependent assay), the combination of both systems constitutes a convenient assay for large screenings. Finally, comparison of the effects of the drug on the whole reconstituted system (three-hybrid) and on the direct interaction between EGLNs and HIF α (two-hybrid) could be helpful in the elucidation of the inhibition mechanism of candidate drugs (figure 5).

When considering the modulation of the HIF pathway, it is important to take into account that the relative contribution of each EGLN to HIF regulation seems to be different [17,22,23] and probably cell-type specific [21]. Moreover, it is likely that different EGLN isoforms might have a specific set of target molecules [24,25]. Thus, the development of isoform-specific inhibitors is of great interest. However, since the catalytic site of the three EGLNs members is very similar, the identification of specific inhibitors based on analogues of the 2-OG is probably difficult [48]. On the other hand, our work [49] and that of others [50] have recently demonstrated that the different substrate specificity shown by each EGLN isoform relies on a defined substrate-binding surface relatively far from the catalytic site. Thus, it is theoretically possible to identify molecules that block the HIF-binding region in specific EGLN isoforms. In this regard, use of our system, in particular the direct interaction assay (figure 5 and reference[23]), could aid in the identification/characterization of such a molecule.

During the writing of this manuscript a paper was published describing a yeast two-hybrid system that, similarly to ours, reconstitutes HIF recognition by VHL [51]. However, an important practical difference between the two systems is that the one described by Bex and coworkers

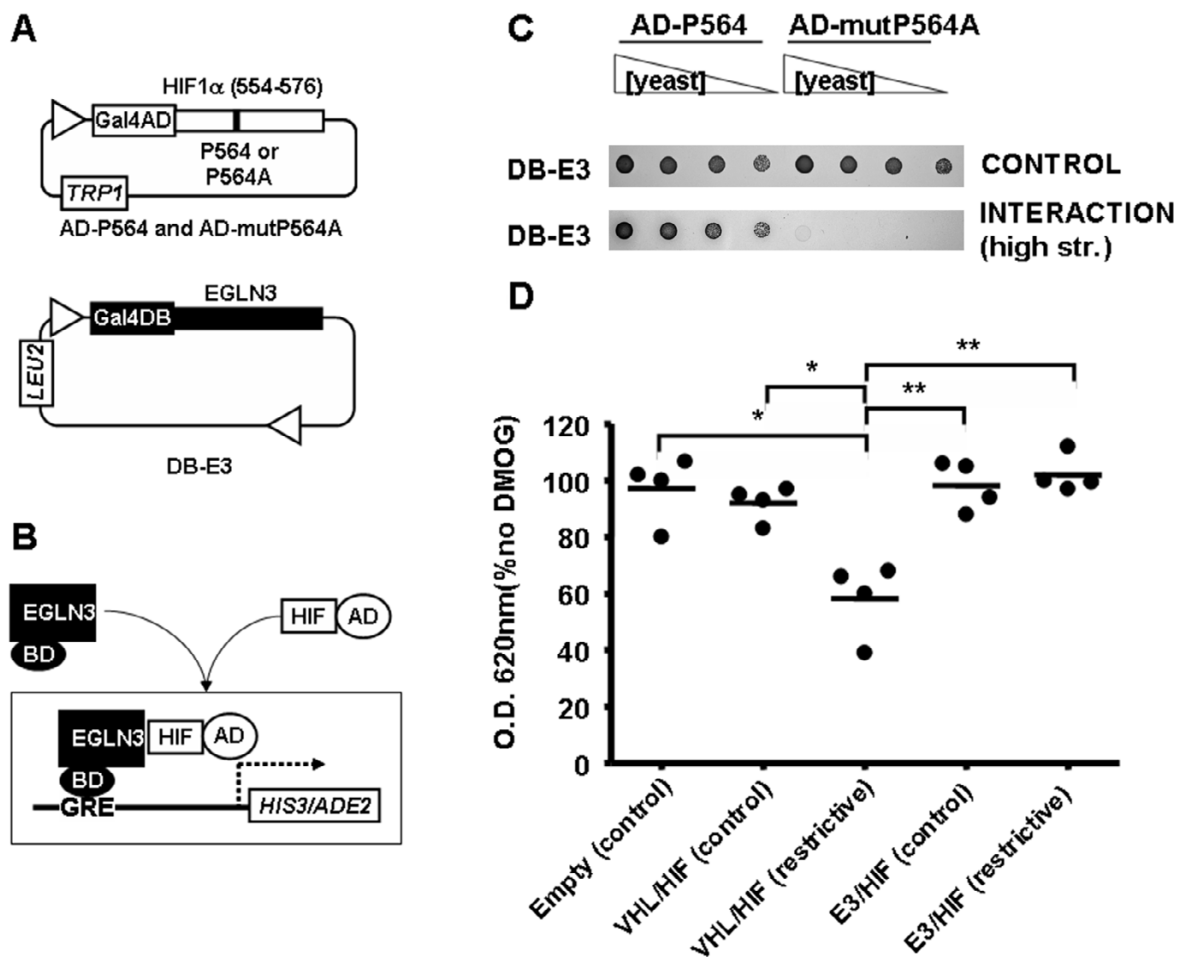


Figure 5
Effect of DMOG on the direct binding of EGLN to HIF. Schematic diagram representing the constructs (A) and the interaction between the different system components (B). C. Serial dilutions of clones representing the indicated constructs were grown on different stringency plates. The results shown are representative of at least three independent experiments. D. Yeast clones transformed with empty pGAD and pBridge plasmids (Empty) or with constructs encoding for AD-P564 and E3/DB-VHL (VHL/HIF) or AD-P564 and DB-E3 (E3/HIF) were used to inoculate control media lacking Leu and Trp (control) or restrictive media (restrictive) lacking Leu, Trp, and His (in the case of E3 clones restrictive media also lacked adenine). Duplicate cell cultures were grown in the presence of 0 or 500 μ M DMOG and the density of cultures was determined 16–24 hours after inoculation. The density values obtained for cultures treated with DMOG were normalized as percentage of the density obtained for cultures in the absence of drug. The graph represents the individual data values of density for each of the four independent experiments. Horizontal bars represent the mean. Statistically significant different mean values are indicated with one ($p < 0.05$) or two ($p < 0.01$) asterisks. Symbols, abbreviations and panel labels are as in figure 1.

required the coexpression of elongins in order to obtain a functional full length VHL.

Conclusion

In summary, the results presented indicate that this system constitutes a simple yet powerful assay to study EGLN biochemistry in a cellular context without the interference of the endogenous HIF system. The system is particularly well suited to screen for modulators of the HIF regulatory machinery. Finally, since the specificity of the reaction cat-

alyzed by the EGLNs is accurately preserved, this system can also be used to characterize novel EGLNs targets.

Methods

Cells and reagents

The *S. cerevisiae* AH109 strain, yeast growth media reagents YPD (yeast extract/peptone/dextrose), SD (synthetic defined) amino acids, X-gal (5-bromo-4-chloroindol-3-yl β -D-galactopyranoside) and plasmids (pGAD and pBridge) were from BD Biosciences, (Palo Alto, CA).

Table 1: Primers used for the generation of the constructs used in this study.

Gene	Primer
Syk	Fw 5'GAATTCAACCACCTGCCCTTCTTT 3'
	Rv 5'GAATTCTGCCGATTTTTTGACATGG 3'
VHL	Fw 5'AGCTGAATTCCTGCGCTCGGTGAACTCGCGC3'
	Rv 5'AGCTCTCGAGGGATCCTCAAGTATACTGGCAGTGTGATATTG3'
FceR1γ	Fw 5'GAATTCGACTGAAGATCCAAGTGC GAAAG 3'
	Rv 5'GAATTCCTACTGTGGTGGTTTCTCATGCTTCAG 3'
Lck	Fw 5'TGATCAGCGGCCCGCCATGGGCTGTGGCTGCAGCTCACAC 3'
	Rv 5'GCGGCCGCTGATCATCAAGGCTGAGGCTGGTACTGGCC 3'
EGLN3	Fw 5'AGCTAAGCTTACCATGAGATCTTCTAGAATGCCCTGGGACACATCATGAGG 3'
	Rv 5'GACTGAATTCTGATCAGTCGACGCTTTCAGTGAGGGCAGATTGAG 3'

Plasmid constructs

Constructs expressing HIF1α(554–576) and hSYK(11–263) as Gal4AD fusion proteins were generated by PCR amplification (figure 5 and reference [23]) of the indicated coding region from human cDNA and cloned into the EcoRI/BamHI or EcoRI sites of pGAD-T7 plasmid (BD Biosciences) respectively. The Gal4DBD fusion proteins were generated by PCR amplification (table 1) of the indicated coding regions from the cloned full length sequence (VHL) or from human cDNA (FceR1γ). VHL (encoding for residues 63–157) and FceR1γ (encoding for residues 45–86) amplicons were then cloned into the XmaI/SalI or EcoRI sites respectively. Finally, the coding sequences for EGLN3 and LCK were PCR-amplified (table 1) and cloned into the BglII or NotI/BglII sites of pBRIDGE-VHL(63–157) or pBRIDGE-FceR1γ (45–86) constructs respectively. LCK was amplified from human cDNA and EGLN-3 was amplified from its cloned cDNA, which was generously provided by Steven L. McKnight. For the two hybrid assays, the constructs expressing Gal4DBD fused to EGLN-3 were generated by cloning its coding sequence into the XmaI/SalI sites of the pBRIDGE plasmid (figure 5 and reference [23]).

In Table 2 are summed up all the constructs used in this study.

Yeast transformation and plate interaction control assays

Freshly made competent yeast cells were transformed with 0.1 μg or 0.3 μg of GAL4AD or GAL4DBD constructs respectively by a modified version of the lithium acetate method (Gietz y col., 1992) and plated on minimal SD media plates in the absence of Leu and Trp for selection of transformants. Subsequently, an equal number of colonies from each transformation was transferred to saline solution (0.9% NaCl) and subjected to serial dilutions. Aliquots of each cell suspension (typically 8 μl) were plated on culture media with different stringencies: (1) control plates lacking leucine/tryptophan (minimal stringency; no interaction between fusion proteins required for yeast growth); (2) restrictive plates lacking leucine, tryptophan and histidine (medium stringency; interaction required to support yeast growth); or (3) restrictive plates lacking leucine, tryptophan, histidine and adenine (maximal stringency; strong interaction required to support yeast growth).

Table 2: Plasmids used in this study.

NAME	VECTOR	Expression from PADHI promoter			Expression from PMET25 promoter	
		Protein	Fragment	MUTATIONS	Protein	Fragment
AD-P564	pGAD-T7	GAL4 AD- HIF	554–576	wt		
AD-mutP564A	pGAD-T7	GAL4 AD- HIF	554–576	P564A		
AD-L574A	pGAD-T7	GAL4 AD- HIF	554–576	L574A		
AD-L562R	pGAD-T7	GAL4 AD- HIF	554–576	L562R		
AD-P402	pGAD-T7	GAL4 AD- HIF	392–414	wt		
AD-SH2	pGAD-T7	GAL4 AD- SYK SH2	11–236	wt		
DB-VHL	pBRIDGE	GAL4 DBD- VHL	63–157	wt		
E3/DB-VHL	pBRIDGE	GAL4 DBD- VHL	63–157	wt	EGLN3	Full length
E1/DB-VHL	pBRIDGE	GAL4 DBD- VHL	63–157	wt	EGLN1	Full length
DB-ITAM	pBRIDGE	GAL4 DBD- ITAM	45–86	wt		
LCK/DB-ITAM	pBRIDGE	GAL4 DBD- ITAM	45–86	wt	LCK	Full length
DB-E3	pBRIDGE	GAL4 DBD- EGLN3	Full length	wt		

Liquid media yeast growth assays

An equal number of fresh (up to two weeks old) yeast colonies were transferred to 6 ml of minimal stringency liquid media and grown overnight at 250 rpm and 30°C. Yeast cells were subsequently pelleted, thoroughly washed with maximal stringency medium and resuspended in 1 ml of the appropriate liquid culture media at a fixed concentration as determined in pilot experiments (Additional file 2). Cultures were then grown at 250 rpm and 30°C for the indicated times. Growth of cell cultures was measured as the increase in 620 nm absorbance of 150 µl culture aliquots taken at initial (t = 0) and the indicated times. For the drug assays, drugs were added to the culture media at t = 0.

Statistical analysis of data

Experimental data were analyzed with the Prism™ GraphPad (version 4.01) software. Data were analyzed by the analysis of variance test (ANOVA) followed by the Tukey's multiple comparison test.

List of abbreviations

HIF, hypoxia inducible factor; EGLN, EGL-nine Homolog; ODD, Oxygen-dependent Degradation Domain; AD, Gal4 activation domain; DB, Gal4 DNA binding domain; DMOG, dimethylxaloylglycine.

Authors' contributions

MA carried out all the experiments shown in figures 1, 2, 3, 4, 5 and Additional file 1. AVV generated the HIF/VHL/EGLN constructs for the two- and three-hybrid assays and did all the preliminary experiments for the hybrid assays. She also performed the experiments in Additional file 1. MOL and LFGF participated in the design and coordination of the study. LdP conceived the study, and participated in its design and coordination. He also performed the statistical analysis and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

Characterization of the EGLN substrate specificity in the yeast three-hybrid system. Yeast cells were treated as indicated in figure 1. AD-L574A and AD-L562R encode for the Gal-4 activation domain fused to HIF1 α derived peptides expanding residues 554–576 and containing L574A or L562R mutations respectively. Mutation L574A prevents HIF hydroxylation by EGLNs [39]. In agreement, expression of none of the EGLN isoforms was able to trigger DB-VHL binding to AD-L574A in spite of the presence of an intact proline 564 residue. In contrast, mutation of L562R specifically affected the recognition of the substrate by EGLN3, while EGLN1 was unaffected. These results are in agreement with previous reports that indicate a preference of EGLN1, but not EGLN3, for arginine at that particular position [23,37]. The result shown is representative of two independent experiments.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2121-9-18-S1.png>]

Additional file 2

kinetics of growth in liquid media. Yeast cells were transformed with constructs expressing AD-P564 and E3/DB-VHL or AD-SH2 and Lck/DB-ITAM. After transformation, cells were selected on plates lacking Leu and Trp. Individual transformed clones were harvested and resuspended in liquid media. The initial concentration of each yeast culture was adjusted in preliminary experiments so that all cultures achieved logarithmic growth in overlapping time windows. The figure shows the absolute densities of each culture at different time points after inoculation. In our assay conditions, the different cultures shared a wide time window (between 16 to 30 hours of growth) in which they all were in the exponential phase of growth. A representative experiment, of at least three independent, is shown.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2121-9-18-S2.png>]

Acknowledgements

We thank Diego Villar for critical reading of this manuscript and his valuable suggestions. This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2005-00180 to L. P. and SAF 2007-60592 to M.O.L.), from Red Cardiovascular (RECAVA to M.O.L.) and Comunidad Autónoma de Madrid (S-SAL-031 I_2006 to L.P. and M.O.L.).

References

1. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J: **Hypoxia signalling controls metabolic demand.** *Current Opinion in Cell Biology* 2007, **19(2)**:223-229.
2. Fukuda R, Zhang H, Kim J, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL: **HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells.** *Cell* 2007, **129(1)**:111-122.
3. Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL: **HIF-1 Inhibits Mitochondrial Biogenesis and Cellular Respiration in VHL-Deficient Renal Cell Carcinoma by Repression of C-MYC Activity.** *Cancer Cell* 2007, **11(5)**:407-420.
4. Hickey MM, Simon MC, Gerald PS: **Regulation of Angiogenesis by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors.** In *Current Topics in Developmental Biology* Volume 76. Academic Press; 2006:217-257.

5. Semenza GL: **Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1.** *Biochem J* 2007, **405(1)**:1-9.
6. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G: **Integration of oxygen signaling at the consensus HRE.** *Sci STKE* 2005, **306**:rel12.
7. Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, Michelson KS, Gunzler V, Kondo K, Yang H, Sorokina I, Conaway RC, Conaway JW, Kaelin WG Jr.: **Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor.** *PNAS* 2002, **99(21)**:13459-13464.
8. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ: **Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation.** *Science* 2001, **292(5516)**:468-472.
9. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML: **Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch.** *Science* 2002, **295(5556)**:858-861.
10. Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Shoumo B, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Schofield CJ: **Hypoxia-inducible Factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family.** *J Biol Chem* 2002, **277(29)**:26351-26355.
11. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, White MF, Bruick RK: **FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor.** *Genes Dev* 2002, **16**:1466-1471.
12. Taylor MS: **Characterization and comparative analysis of the EGLN gene family.** *Gene* 2001, **275(1)**:125-132.
13. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ: **Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation.** *EMBO J* 2001, **20(18)**:5197-5206.
14. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr.: **HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing.** *Science* 2001, **292(5516)**:464-468.
15. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ: **The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.** *Nature* 1999, **399(6733)**:271-275.
16. Ehrismann D, Flashman E, Genn DN, Mathioudakis N, Hewitson KS, Ratcliffe PJ, Schofield CJ: **Studies on the activity of the hypoxia-inducible-factor hydroxylases using an oxygen consumption assay.** *Biochem J* 2007, **401(1)**:227-234.
17. Koivunen P, Hirsila M, Kivirikko KI, Myllyharju J: **The length of peptide substrates has a marked effect on hydroxylation by the HIF prolyl 4-hydroxylases.** *The Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**:28712-28720.
18. Stolze IP, Tian YM, Appelhoff RJ, Turley H, Wykoff CC, Gleadle JM, Ratcliffe PJ: **Genetic Analysis of the Role of the Asparaginyl Hydroxylase Factor Inhibiting Hypoxia-inducible Factor (HIF) in Regulating HIF Transcriptional Target Genes.** *The Journal of Biological Chemistry* 2004, **279(41)**:42719-42725.
19. Bruick RK, McKnight SL: **A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF.** *Science* 2001, **294(5545)**:1337-1340.
20. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ: **C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxigenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation.** *Cell* 2001, **107(1)**:43-54.
21. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM: **Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2 and PHD3 in the regulation of the hypoxia inducible factor.** *The Journal of Biological Chemistry* 2004, **279(37)**:38458-38465.
22. Hirsilä M, Koivunen P, Günzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J: **Characterization of the Human Prolyl 4-Hydroxylases That Modify the Hypoxia-Inducible Factor HIF.** *J Biol Chem* 2003, **278(33)**:30772-30780.
23. Landazuri MO, Vara-Vega A, Viton M, Cuevas Y, del Peso L: **Analysis of HIF-prolyl hydroxylases binding to substrates.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, **351(2)**:313-320.
24. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, Taylor CT: **Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity.** *PNAS* 2006, **103(48)**:18154-18159.
25. Koditz J, Nesper J, Wottawa M, Stiehl DP, Camenisch G, Franke C, Myllyharju J, Wenger RH, Katschinski DM: **Oxygen-dependent ATF-4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor.** *Blood* 2007, **110(10)**:3610-3617.
26. Bartrons R, Caro J: **Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2007, **39(3)**:223-229.
27. Calzada MJ, Del Peso L: **Hypoxia-inducible factors and cancer.** *Clinical and Translational Oncology* 2007, **9(5)**:278-289.
28. Bernhardt WM, Warnecke C, Willam C, Tanaka T, Wiesener MS, Eckardt KU, Helmut Sies and Bernhard B: **Organ Protection by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors.** In *Methods in Enzymology Volume 435*. Academic Press; 2007:219, 221-245.
29. Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, Trush MA, Semenza GL: **Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 α .** *Cardiovasc Res* 2007:cvm035.
30. Melillo G, Helmut Sies and Bernhard B: **Hypoxia-Inducible Factor 1 Inhibitors.** In *Methods in Enzymology Volume 435*. Academic Press; 2007:385-402.
31. Warnecke C, Griethe W, Weidemann A, Jürgensen JS, Willam C, Bachmann S, Ivashchenko Y, Wagner I, Frei U, Wiesener M, Eckardt KU: **Activation of the hypoxia-inducible factor pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors.** *The FASEB Journal* 2003, **17(9)**:1186-1188.
32. Hewitson KS, Schofield CJ, Ratcliffe PJ, Helmut Sies and Bernhard B: **Hypoxia-Inducible Factor Prolyl-Hydroxylase: Purification and Assays of PHD2.** In *Methods in Enzymology Volume 435*. Edited by: Br HSB. Academic Press; 2007:25-42.
33. Wirthner R, Balamurugan K, Stiehl DP, Barth S, Spielmann P, Oehme F, Flamme I, Katschinski DM, Wenger RH, Camenisch G, Helmut Sies and Bernhard B: **Determination and Modulation of Prolyl-4-Hydroxylase Domain Oxygen Sensor Activity.** In *Methods in Enzymology Volume 435*. Academic Press; 2007:43-60.
34. Arquier N, Vigne P, Duplan E, Hsu T, Therond PP, Frelin C, D'Angelo G: **Analysis of the hypoxia-sensing pathway in Drosophila melanogaster.** *Biochem J* 2006, **393(2)**:471-480.
35. Chan DA, Sutphin PD, Denko NC, Giaccia AJ: **Role of Prolyl Hydroxylation in Oncogenically Stabilized Hypoxia-inducible Factor-1 α .** *The Journal of Biological Chemistry* 2002, **277(42)**:40112-40117.
36. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TDW, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY: **Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL.** *Nature* 2002, **417(6892)**:975-978.
37. Li D, Hirsilä M, Koivunen P, Brenner MC, Xu L, Yang C, Kivirikko KI, Myllyharju J: **Many amino acid substitutions in a HIF-1 α -like peptide cause only minor changes in its hydroxylation by the HIF prolyl 4-hydroxylases: Substitution of 3,4-dehydroproline or azetidine-2-carboxylic acid for the proline leads to a high rate of uncoupled 2-oxoglutarate decarboxylation.** *The Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**:55051-55059.
38. Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS: **Sequence Determinants in Hypoxia-inducible Factor-1 α for Hydroxylation by the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3.** *J Biol Chem* 2002, **277(42)**:39792-39800.
39. Kageyama Y, Koshiji M, To KKW, Tian YM, Ratcliffe PJ, Huang LE: **Leu-574 of human HIF-1 α is a molecular determinant of prolyl hydroxylation.** *FASEB J* 2004, **18(9)**:1028-1030.
40. Osborne MA, Dalton S, Kochan JP: **The yeast tribrid system--genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactions.** *Biotechnology* 1995, **13(13)**:1474-1478.
41. Asikainen TM, Ahmad A, Schneider BK, Ho WB, Arend M, Brenner M, Gunzler V, White CV: **Stimulation of HIF-1 α , HIF-2 α , and VEGF by prolyl 4-hydroxylase inhibition in human lung endothelial and epithelial cells.** *Free Radical Biology and Medicine* 2005, **38(8)**:1002-1013.
42. Cunliffe CJ, Franklin TJ, Hales NJ, Hill GB: **Novel inhibitors of prolyl 4-hydroxylase. 3. Inhibition by the substrate analogue N-oxalalglycine and its derivatives.** *Journal of Medicinal Chemistry* 1992, **35(14)**:2652-2658.

43. Hirsila M, Koivunen P, Xu L, Seeley T, Kivirikko KI, Myllyharju J: **Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway.** *FASEB J* 2005, **19(10)**:1308-1310.
44. Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS: **Depletion of Intracellular Ascorbate by the Carcinogenic Metals Nickel and Cobalt Results in the Induction of Hypoxic Stress.** *The Journal of Biological Chemistry* 2004, **279(39)**:40337-40344.
45. Yun CW, Ferea T, Rashford J, Ardon O, Brown PO, Botstein D, Kaplan J, Philpott CC: **Desferrioxamine-mediated Iron Uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. EVIDENCE FOR TWO PATHWAYS OF IRON UPTAKE.** *The Journal of Biological Chemistry* 2000, **275(14)**:10709-10715.
46. Stebbins CE, Kaelin WG Jr., Pavletich NP: **Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function.** *Science* 1999, **284(5413)**:455-461.
47. Tan S: **A Modular Polycistronic Expression System for Over-expressing Protein Complexes in *Escherichia coli*.** *Protein Expression and Purification* 2001, **21(1)**:224-234.
48. McDonough MA, Li V, Flashman E, Chowdhury R, Mohr C, Lienard BMR, Zondlo J, Oldham NJ, Clifton IJ, Lewis J, McNeill LA, Kurzeja RJM, Hewitson KS, Yang E, Jordan S, Syed RS, Schofield CJ: **Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2).** *PNAS* 2006, **103(26)**:9814-9819.
49. Villar D, Vara-vega A, Landáuzuri MO, DelÁ peso L: **Identification of a region on hypoxia-inducible-factor prolyl 4-hydroxylases that determines their specificity for the oxygen degradation domains.** *Biochem J* 2007, **408(2)**:231-240.
50. Flashman E, Bagg EAL, Chowdhury R, Mecinovic J, Loenarz C, McDonough MA, Hewitson KS, Schofield CJ: **Kinetic rationale for selectivity towards N- and C-terminal oxygen dependent degradation domain substrates mediated by a loop region of HIF prolyl hydroxylases.** *The Journal of Biological Chemistry* 2007:M707411200.
51. Bex C, Knauth K, Dambacher S, Buchberger A: **A yeast two-hybrid system reconstituting substrate recognition of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.** *Nucl Acids Res* 2007, **35(21)**:e142.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

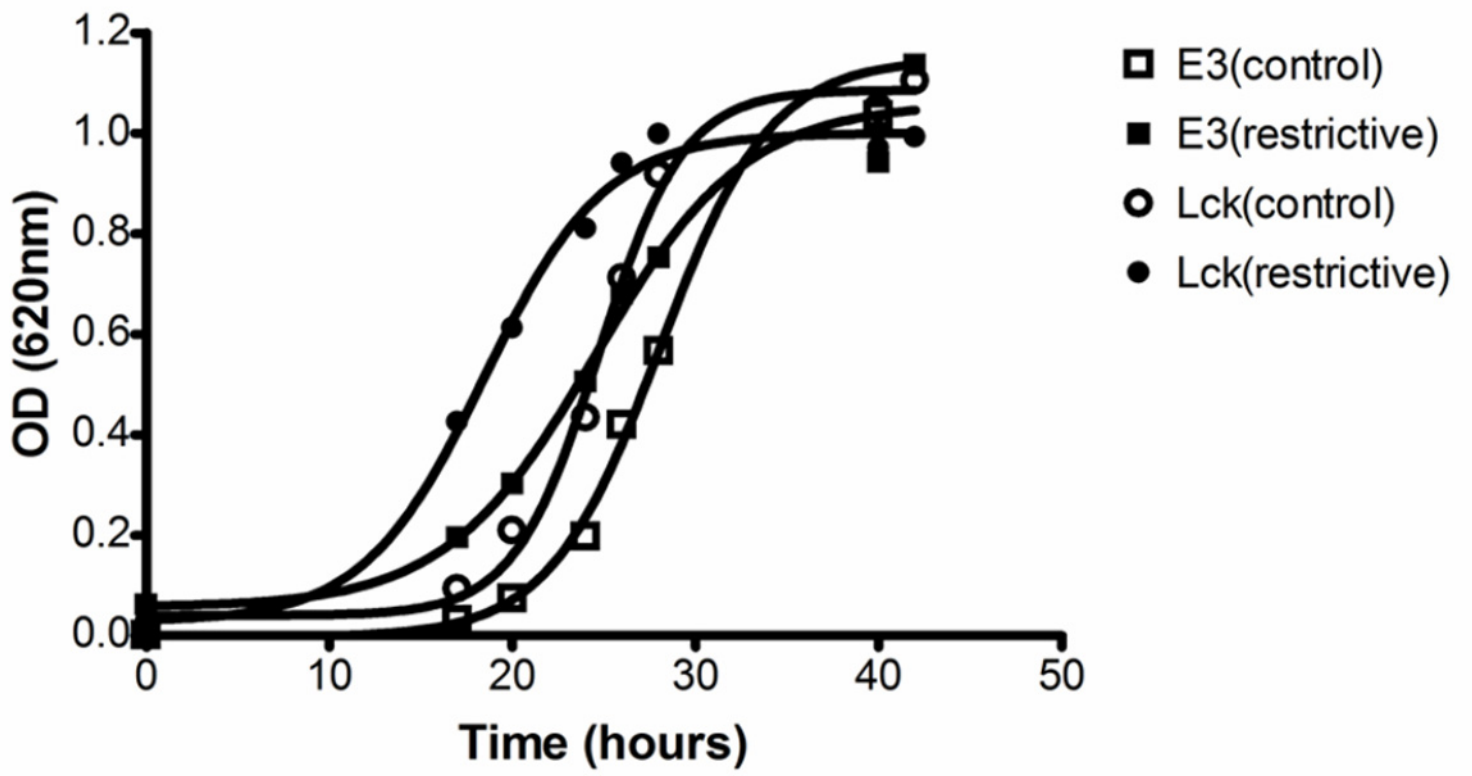
Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

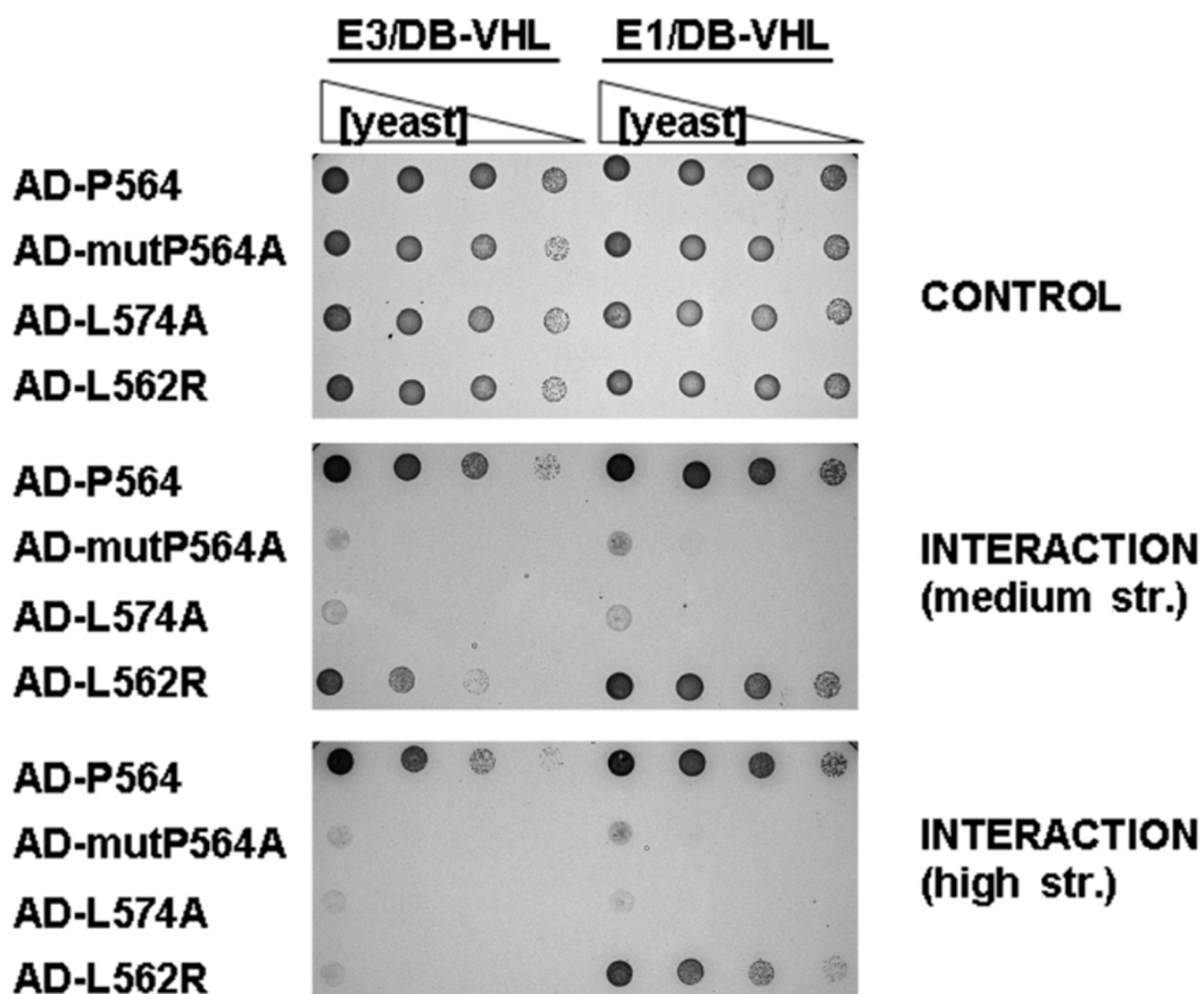
Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp







Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the *egl nine* homologue 3 (*egl n3/phd3*) gene

Nuria PESCADOR*¹, Yolanda CUEVAS*¹, Salvador NARANJO*, Marisa ALCAIDE*[†], Diego VILLAR*, Manuel O. LANDÁZURI[†] and Luis DEL PESO*²

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo s/n, 28029 Madrid, Spain, and [†]Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Diego de León 62, 28006 Madrid, Spain

Low oxygen levels induce an adaptive response in cells through the activation of HIFs (hypoxia-inducible factors). These transcription factors are mainly regulated by a group of proline hydroxylases that, in the presence of oxygen, target HIF for degradation. The expression of two such enzymes, EGLN1 [EGL nine homologous protein 1, where EGL stands for egg laying defective (*Caenorhabditis elegans* gene)] and EGLN3, is induced by hypoxia through a negative feedback loop, and we have demonstrated recently that hypoxic induction of EGLN expression is HIF-dependent. In the present study, we have identified an HRE (hypoxia response element) in the region of the EGLN3 gene using a combination of bioinformatics and biological approaches. Initially, we isolated a number of HRE consensus sequences in a region of 40 kb around the human EGLN3 gene and studied their evolutionary conservation. Subsequently, we examined the

functionality of the conserved HRE sequences in reporter and chromatin precipitation assays. One of the HREs, located within a conserved region of the first intron of the EGLN3 gene 12 kb downstream of the transcription initiation site, bound HIF *in vivo*. Furthermore, this sequence was able to drive reporter gene expression under conditions of hypoxia in an HRE-dependent manner. Indeed, we were able to demonstrate that HIF was necessary and sufficient to induce gene expression from this enhancer sequence.

Key words: EGL nine homologous protein 3 (EGLN3), HIF proline hydroxylase 3 (HPH3), hypoxia-inducible factor (HIF), hypoxia response element (HRE), proline hydroxylase domain 3 (PHD3), prolyl hydroxylase.

INTRODUCTION

Oxygen is indispensable for the correct functioning of a cell, and thus cells respond to hypoxia (1% oxygen) by inducing evolutionarily conserved programmes of gene expression aimed at keeping the cell viable and restoring the oxygen supply. HIFs (hypoxia-inducible factors) are a group of basic helix–loop–helix Per-ARNT-Sim transcription factors that are central to this adaptive response [1]. HIFs are heterodimers of an oxygen-regulated α subunit (HIF α) and a constitutive β subunit (HIF β /ARNT) that can also associate with other transcription factors not involved in oxygen homeostasis [1,2]. In vertebrates, three different HIF α subunits (HIF1 α , 2 α and 3 α) have been described [1]. Although these are thought to be similarly regulated by oxygen, their tissue distribution [3–5] and target genes [6,7] may differ. The importance of HIF factors, as well as the molecular machinery responsible for their oxygen-dependent regulation, is reflected in their high degree of conservation in multicellular animals from nematodes to mammals [1].

The oxygen concentration regulates the levels of HIF α protein, as well as their transactivation capacity [8]. Under normoxic conditions, HIF α subunits undergo hydroxylation of two specific proline residues [9–11], a modification that is mediated by the activity of a family of 2OG (2-oxoglutarate)-dependent hydroxylases termed PHDs (proline hydroxylase domains), HPHs (HIF proline hydroxylases) or EGLNs [EGL nine homologous proteins, where EGL stands for egg laying defective (*Caenorhabditis elegans* gene)] [12,13]. As a result, the hydroxyprolines are

specifically recognized by the product of the VHL (von Hippel–Lindau) tumour suppressor gene, which forms part of an E3 ubiquitin ligase complex, targeting HIF α for degradation by the proteasome [9,10]. In addition to proline hydroxylation, HIF α subunits can also be hydroxylated at a conserved asparagine residue located in one of the two HIF α transactivation domains [C-TAD (C-terminal transactivation domain)] [14]. The enzyme responsible for asparagine hydroxylation, FIH (factor inhibiting HIF-1) [15], is also a 2OG-dependent hydroxylase, and this hydroxylation in the C-TAD of HIF prevents its interaction with the p300 transcriptional co-activator. Since molecular oxygen is a co-substrate in the reaction catalysed by EGLNs and FIH, these reactions are compromised in the absence of oxygen. Proline hydroxylation is particularly affected by hypoxia because of the elevated Michaelis–Menten constant, K_m for oxygen displayed by EGLNs [16]. Hence, under normoxic conditions, the efficient degradation of the α subunit promoted by the EGLNs impairs HIF transcription and its transcriptional activity is weakened due to FIH hydroxylation. On the other hand, a restricted oxygen availability leads to accumulation of HIF α due to the reduction in proline hydroxylation and an increase in its transcriptional activity through its interaction with p300. The stabilization of HIF α promotes its interaction with HIF β subunits and p300, forming a complex that binds to specific sequences (HREs, hypoxia response elements) in target genes [17].

The hypoxic response includes the switch to anaerobic metabolism and the induction of angiogenesis and erythropoiesis among other events. Accordingly, functional HREs have been

Abbreviations used: ChIP, chromatin immunoprecipitation; CNS, conserved non-coding sequence; EGLN, EGL [egg laying defective (*Caenorhabditis elegans* gene)] nine homologous protein; HIF, hypoxia-inducible factor; FIH, factor inhibiting HIF-1; HRE, hypoxia response element; UTR, untranslated region; VEGF, vascular endothelial growth factor; VHL, von Hippel–Lindau.

¹ These authors have contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed (email lpeso.hlpr@salud.madrid.org or luis.peso@uam.es).

identified in the regulatory region of the glucose transporter Glut-1 and in most of the genes encoding glycolytic enzymes such as aldolase A, phosphoglycerate kinase 1, enolase 1 and lactate dehydrogenase A [17]. Also regulatory regions of the genes encoding VEGF (vascular endothelial growth factor), a potent pro-angiogenic factor, and erythropoietin, a cytokine involved in the differentiation of red blood cells, contain functional HREs [17]. However, the list of oxygen-induced genes is not restricted to those involved in glycolysis or angiogenesis. The presence of functional HREs has also been demonstrated in many other genes involved in a wide range of biological activities such as those encoding P4H α , BNIP3, Noxa, Nur77, inducible NOS, endothelial NOS, ROR α 4, c-Met, CXCR4, PAI1, DEC1/2, leptin, endothelin1, ceruloplasmin, transferrin and haem oxygenase 1. The HREs of all these genes contain the core sequence [A/G]CGT, which in most cases is ACGTG [17]. In addition, HIF transcription factors show preference for specific bases in the proximity of the core that has led to the description of the following consensus HRE sequence: [T/G/C][A/G]CGTG[CGA][GTC][GTC][CTG] [17].

Importantly, EGLN1 and EGLN3 mRNAs, but not those for EGLN2 or FIH, are strongly induced by hypoxia in most cell types [18]. This effect is probably important for cellular adaptation to hypoxic conditions and is responsible for the increased oxygen-mediated HIF α degradation observed after long periods of hypoxia [19]. Indeed, the induction of EGLN3 mRNA expression by hypoxia is particularly significant when compared with other hypoxia-responsive genes [18,20,21]. Recently, it was shown that HIF-deficient cells [20] or cells in which HIF α mRNA was suppressed with small interfering RNA [22], did not up-regulate EGLN3 in response to hypoxia. Moreover, we found that VHL-deficient cells presented very high normoxic levels of EGLN3 that reverted upon restoration of VHL function [20,22]. Thus the hypoxic induction of EGLN3 appears to be mediated by HIF. The promoter of the rat EGLN3 gene (Sm-20) has recently been defined, yet no regulatory regions responsible for its hypoxic induction have been detected [23]. We describe here the identification of a functional HRE, located in the first intron of the EGLN3 gene, that is responsible for its hypoxic induction.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and reagents

Cells of the human HeLa cervix carcinoma cell line were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Basel, Switzerland), while the Chinese-hamster ovary-derived cell lines 4.5 and Ka13 [24] were grown in Ham's nutrient mixture, F-12 (Euroclone, Rehovot, Israel). In all cases, the culture medium was supplemented with 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% (v/v) fetal bovine serum. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Experiments under hypoxic conditions (1% O₂) were performed in an *In vivo* 400 Hypoxia Workstation (Ruskin Technology, Leeds, U.K.).

Plasmid constructs

To clone the EGLN3 promoter region, human genomic sequences from -3410 to +170 and -1465 to +170 relative to the transcription initiation site of the EGLN3 gene were amplified by PCR using primers 1+2 and 3+2 (Table 1) respectively. The PCR products were cloned into the pCR 2.1-TOPO TA plasmid (Invitrogen, Leek, The Netherlands) and then subcloned into the XhoI and NheI sites of the pGL3 basic luciferase plasmid (Promega, Mannheim, Germany) to generate pGL3-E3P3.5 and pGL3-E3P1 respectively.

Table 1 Primers used in the present study

The primers listed were used to amplify the regions indicated from human EGLN3 genomic fragment, except for primers 15 and 16, which were used to amplify the region indicated from human collagen proline-4 hydroxylase α , and primers 10 and 11, which were used to introduce mutations into the cloned enhancer A sequence.

No.	Target	Position	Dir.	Sequence
1	Promoter	-3410	F	CTCGAGCTAGCGCAGATGCACACTGGAAGACAATG
2	Promoter	+147	R	CTCGAGGTTTCTCGCAACTCTCGGGAGAAG
3	Promoter	-1465	F	GTTCTGTCTGGATGTCATTCCC
4	Enhancer A	+12411	F	TCCCTGGGCTGGACTGACCTTT
5	Enhancer A	+12836	R	CCTCCCCAAGAAGCCACTGAAA
6	Enhancer A	+12472	F	TTCTCTGGTACTGGGGTAGAGAT
7	Enhancer A	+12728	R	GAGCCCATGCAATAGGCACAGTA
8	Enhancer D	+739	F	TCCGAGTCCGTGTATGTCGACTT
9	Enhancer D	+1099	R	TGAAGGGCAGTATTAGGTGGCTTT
10	Mutant A	NA	F	TCACGCAGCGCTAGCAGCCCTGTCCAC
11	Mutant A	NA	R	GTGACAGGGCTGTAGCGCTGCGTGA
12	Promoter	-1685	F	CAAGGAGGGGTACCTCCTGCTCAA
13	Promoter	-1418	R	CCTCTGTCCCTGAGGGGAGAAA
14	Promoter	-2298	F	CAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTA
15	P4H α prom	-329	F	ATCAAGGAGGCAAACCTGAACAG
16	P4H α prom	+34	R	ACTCGGAGCGGCTACTTCCTA

The sequences containing putative hypoxia-inducible regulatory sequences were amplified by PCR with the primers indicated in Table 1. The resulting amplified fragments were cloned into the pCR 2.1-TOPO TA plasmid (Invitrogen) and then subcloned into the BamHI and XhoI sites upstream of a minimal rat prolactin promoter (pProl-) to drive firefly luciferase expression [25]. In all cases, HeLa genomic DNA was used as a template for the PCRs. The mutant HRE form of enhancer A was generated by PCR with primers 10 and 11 (Table 1). The wild-type or mutant HRE enhancer A sequences were cloned into the XbaI site of pGL3-E3P3.5 to generate pGL3-E3P3.5A or pGL3-E3P3.5A* respectively.

Reporter assays

Cells were plated in six-well plates 24 h before transfection. Each plate was transfected with 9 μ g of a DNA mixture containing 3 μ g (HeLa cells) or 5 μ g (4.5/Ka13 cells) of the indicated reporter plasmid and 0.1 μ g of a plasmid encoding for *Renilla* firefly luciferase under the control of a SV40 promoter. Some 12–13 h after transfection, the cells were replated in 24-well plates and then transferred to hypoxic conditions (1% oxygen) or left under normoxic conditions for an additional 24 h as indicated. Subsequently, the cells were harvested and the firefly luciferase activity was determined using a dual luciferase system (Promega) in which the firefly luciferase activity was normalized with respect to the *Renilla* luciferase activity. Each experimental condition was measured in duplicate.

ChIP (chromatin immunoprecipitation)

For the ChIP assays, HeLa cells were grown on 10 cm plates until they reached 85% confluence, at which point they were exposed to hypoxia (1% oxygen) or left under normoxic conditions for a further 5 h. Subsequently, the cells were fixed with 1% (v/v) formaldehyde (final concentration) for 12 min at 37°C, which was stopped by the addition of 0.125 M glycine (final concentration). The cells were washed with cold PBS and then lysed by scraping in 1 ml of lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 8.1, and a protease inhibitor). Cell lysates were incubated on ice for 10 min and then sonicated to shear the DNA under conditions established to ensure that the DNA

fragments were between 200 and 1500 bp. After the removal of the insoluble material by centrifugation, 30 μ l of each sample was removed and stored (input), while the rest was diluted in immunoprecipitation buffer (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl and 20 mM Tris/HCl, pH 8.1). The lysates were precleared with preimmune serum and 200 μ g of a Salmon Sperm DNA/Protein A agarose 50% slurry (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, U.S.A.) for 1 h at 4°C. The samples were then immunoprecipitated twice, initially with whole rabbit serum for 6 h (IgG control) and then overnight at 4°C with a polyclonal anti-HIF1 alpha antiserum (Abcam, ab2185). Immunocomplexes were recovered by the addition of 400 μ g of Salmon Sperm DNA/Protein A agarose 50% slurry to the samples that were then sequentially washed for 15 min in TSE I (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl, pH 8.1, and 150 mM NaCl), TSE II (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl, pH 8.1, and 500 mM NaCl) and buffer III (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA and 10 mM Tris/HCl, pH 8.1). Finally, the complexes were washed twice with TE buffer (10 mM Tris, pH 8.0, and 1 mM EDTA) and extracted twice with a buffer containing 1% SDS and 0.1 M NaHCO₃. The eluates were pooled, and cross-linking was reversed by the addition of 200 mM NaCl (final concentration) and incubating overnight at 65°C. The proteins were removed by the addition of proteinase K (30 μ g/sample) for 2 h at 42°C, and the DNA was extracted using Qiagen PCR extraction kit before eluting in 50 μ l of water. Immunoprecipitated DNA was amplified by PCR using the primers indicated, and the PCR products were resolved by gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining.

Computer identification of HREs

To generate a position-specific frequency matrix for HIF recognition, we aligned several sequences (100 bp) from known hypoxia-inducible genes: VEGF [26–28], aldolase A [29,30], phosphoglycerate kinase 1 [29,31], erythropoietin [32–35], haem oxygenase 1 [36], ROR α 4 [37], Glut-1 [38], P4H α [39], BNIP3 [40] and c-Met [41]. In the case of VEGF, Epo, ROR α 4, Glut-1, P4H α and BNIP3, both human and rodent sequences were included in the alignment. We then calculated the residue frequencies at each position of the aligned sequences and compared them with the frequency expected by chance (χ^2 test). This analysis (Table 2) showed that, in addition to those positions corresponding to the [A/G]CGT core, several other positions presented a nucleotide composition significantly different from that expected by chance ($P < 0.05$). From this alignment, we constructed a 33 bp position-specific matrix with the frequencies observed at positions –8 to +26 (+1 corresponding to the first base of the [A/G]CGT core).

To identify potential regulatory sequences containing an HRE core, we first searched both DNA strands of the 40 kb human EGLN3 locus (–9675 to +30326 relative to transcription start) for the presence of the [A/G]CGT motif. This produced a list of 124 sequences for the human locus and 129 for the mouse locus. We then calculated a score for each one of the 33 bp genomic sequences containing an [A/G]CGT core using the position-specific matrix of frequencies (Table 2). The score was calculated as:

$$\left(\sum_{j=-8}^{j=+25} \text{Freq}_{ij} \right) - mi$$

where i is the nucleotide (adenosine, cytosine, guanosine or thymidine) at position j of the sequence analysed, and Freq_{ij} is

Table 2 Position-specific frequency matrix

Position indicates the position relative to the first base of the HRE core. A, C, G, T, frequencies of these nucleotides at each position. P is the probability value obtained by comparison of the nucleotide frequency distribution at a determined position with that expected by chance (χ^2 test). Frequencies of nucleotides at the HRE core are shown in bold face.

Position	A	C	G	T	P
–8	0.000	0.630	0.250	0.130	0.003
–7	0.250	0.130	0.500	0.130	0.112
–6	0.060	0.500	0.310	0.130	0.058
–5	0.190	0.060	0.500	0.250	0.090
–4	0.130	0.560	0.310	0.000	0.009
–3	0.130	0.560	0.250	0.060	0.023
–2	0.190	0.190	0.560	0.060	0.029
–1	0.000	0.310	0.250	0.440	0.090
+1	0.810	0.000	0.190	0.000	< 0.001
+2	0.000	1.000	0.000	0.000	< 0.001
+3	0.000	0.000	1.000	0.000	< 0.001
+4	0.000	0.000	0.000	1.000	< 0.001
+5	0.000	0.060	0.940	0.000	< 0.001
+6	0.250	0.500	0.130	0.130	0.112
+7	0.000	0.310	0.560	0.130	0.009
+8	0.250	0.250	0.380	0.130	0.572
+9	0.130	0.130	0.250	0.500	0.112
+10	0.380	0.500	0.060	0.060	0.023
+11	0.250	0.380	0.190	0.190	0.682
+12	0.060	0.130	0.750	0.060	< 0.001
+13	0.310	0.130	0.500	0.060	0.058
+14	0.190	0.440	0.250	0.130	0.321
+15	0.560	0.250	0.190	0.000	0.015
+16	0.130	0.440	0.440	0.000	0.023
+17	0.130	0.310	0.500	0.060	0.058
+18	0.130	0.440	0.310	0.130	0.212
+19	0.310	0.310	0.310	0.060	0.392
+20	0.060	0.630	0.250	0.060	0.004
+21	0.190	0.190	0.440	0.190	0.392
+22	0.130	0.500	0.250	0.130	0.112
+23	0.190	0.310	0.250	0.250	0.919
+24	0.000	0.440	0.130	0.440	0.023
+25	0.190	0.690	0.000	0.130	0.001

the frequency of nucleotide i at position j of the position-specific matrix of frequencies (read from Table 2, j corresponds to the position column). The positions are relative to the [A/G]CGT core, the first base of this core being (A or G) in position +1. Finally, mi is the minimum theoretical score value (5.27) for any sequence containing an [A/G]CGT core.

Thus, while the identification of a potential HRE is based solely on the presence of an [A/G]CGT core, the final score associated with each HRE-containing sequence is based on the comparison of the whole 33 bp sequence with the position-specific matrix (Table 2). For example, the score attributed to the sequence AC-AGGGCTACGTGCGCTGCGTGAGGGTGGCAGC (enhancer A, see text for details) will be: (0.00 + 0.13 + 0.06 + 0.5 + 0.31 + 0.25 + 0.19 + 0.44 + 0.81 + 1 + 1 + 1 + 0.94 + 0.5 + 0.56 + 0.25 + 0.5 + 0.06 + 0.38 + 0.75 + 0.06 + 0.25 + 0.56 + 0.44 + 0.5 + 0.31 + 0.06 + 0.25 + 0.44 + 0.5 + 0.19 + 0.13 + 0.69) – 5.25 = 8.758.

Statistical analysis of data

Experimental data were analysed with the Prism™ GraphPad (version 4.01) software. Data from reporter assays were analysed by the ANOVA test followed by the Tukey test. The P values obtained in these analyses are indicated in the text and Figures. Other statistical tests were applied to specific datasets as indicated in the text (t test and χ^2 test).

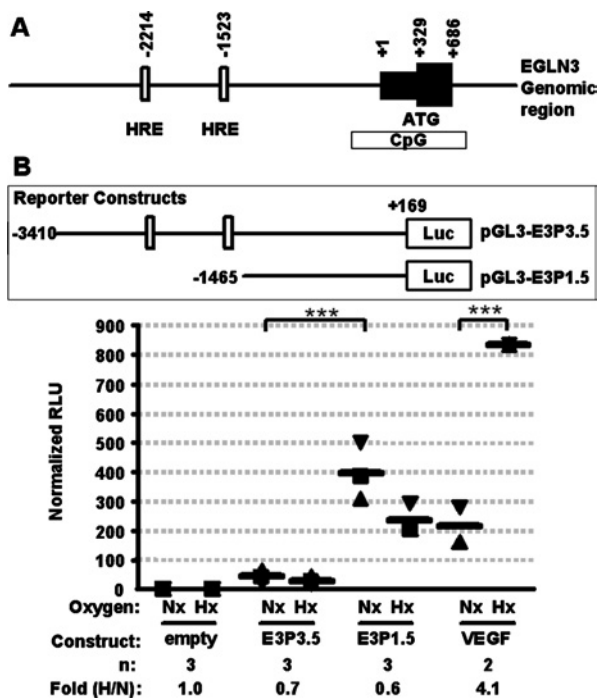


Figure 1 The EGLN3 promoter region is not induced by hypoxia

(A) Diagram of the human EGLN3 promoter region, in which the numbers indicate the nucleotide positions relative to the transcription initiation site. Black boxes represent the first EGLN3 exon comprising residues +1 to +686. The small black box corresponds to the 5'-UTR (from +1 to +329) and the large one to the coding sequence (from +329 to +686). CpG, location of a CpG-rich region according to the UCSD Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>). Open boxes indicate the localization of putative HRE core sequences. The regions indicated, -3410 to +169 and -1465 to +169, in the EGLN3 genomic fragment were cloned into pGL3 basic vectors upstream of the firefly luciferase gene to generate pGL3-E3P3.5 and pGL3-E3P1.5 respectively. (B) HeLa cells were transfected with the fragments indicated on EGLN3 or from the VEGF-A promoter cloned into the pGL3 basic reporter plasmid. Upper panel: diagram of the pGL3-E3P3.5 and pGL3-E3P1.5 constructs. Lower panel: after transfection, the cells were cultured under normoxic conditions (Nx) or in an atmosphere of 1% oxygen (Hx) for 24 h before analysing the luciferase activity. The mean results from 'n' independent experiments, each performed in duplicate (solid bar) are shown. Each type of symbol represents data from an individual experiment. In order to compare between different experiments, the ratio of firefly and *Renilla* luciferase activities for each sample was normalized to the ratio obtained for the control (empty vector under normoxia). ***, statistically significant differences ($P < 0.001$) between the two indicated samples. The fold induction of hypoxia versus normoxia for each sample is shown.

RESULTS

EGLN3 gene promoter activity is not induced by hypoxia

In order to study the regulation of EGLN3 transcription by hypoxia, we cloned the putative promoter region of the human EGLN3 gene. To this end, we PCR-amplified the region between nt -3410 and +170 (E3P3.5) relative to the EGLN3 transcription initiation site and cloned this upstream to a firefly luciferase reporter gene (Figure 1A). This genomic region contains two putative HRE that match the [A/G]CGT consensus. We then also generated a reporter construct containing the genomic region -1465 to +170 (E3P1.5) that lacks these two putative HREs. Both genomic regions E3P3.5 and E3P1.5 acted as promoters capable of driving luciferase expression above control levels (Figure 1B). Interestingly, stronger promoter activity was observed with the shortest fragment (E3P1.5), suggesting the presence of a negative regulatory sequence in the longer fragment (E3P3.5). However, in contrast with promoters induced by hypoxia (e.g. the VEGF-A promoter), hypoxia did not induce promoter activity of either E3P1.5 or E3P3.5 (Figure 1B). Thus it appears that the

regulatory sequences responsible for the induction of EGLN3 expression under hypoxic conditions are not located in this promoter region.

Identification of putative HREs in the EGLN3 genomic region

In view of the results presented above, we reasoned that an enhancer region might be responsible for the induction of EGLN3 by hypoxia. Since enhancers can be located upstream or downstream of and even far from the transcriptional initiation site, we employed a strategy based on bioinformatics – to search for putative HREs in a large genomic region of the human EGLN3 locus (*Homo sapiens* chromosome 14 genomic contig NT_026437.11, gi 29736559:14310000–14350000). This region extends from 9 kb upstream of the transcription initiation site to 3.5 kb downstream of the last exon of the gene. Since the probability of encountering a short motif such as the canonical HRE [A/G]CGT over 40 kb is very large, we first generated an extended HRE consensus motif to screen this genomic fragment. For this, we selected a set of well-characterized hypoxia-induced regulatory sequences from the alignment of the promoters of several hypoxia-induced genes (see the Materials and methods section). Analysis of the sequences revealed that, in addition to the [A/G]CGT core, other positions extending over 33 bp showed a significant degree of conservation ($P < 0.05$, χ^2 test). From this alignment, we generated a 33 bp position-specific probability matrix based on the frequencies observed for the nucleotides at each position of the aligned sequences around and including the HRE core motif (Table 2).

By comparing the nucleotide composition of putative HREs with this position-specific frequency matrix, a score can be assigned to any sequence that will reflect its similarity to known functional hypoxia-responsive sequences. The scoring method used assigned a value of zero to sequences lacking the highly conserved [A/G]CGT core and increasing values to sequences that were more similar to those observed in the known hypoxia-responsive regulatory regions. In this way, the scores obtained for several 33 bp-long sequences containing functional HREs from known hypoxia-induced genes (9.871 ± 1.222 , $n = 17$) were significantly higher ($P < 0.0001$, t test) than those obtained for a group of random sequences containing the [A/G]CGT core (5.809 ± 0.772 , $n = 17$; Figure 2A).

To identify potential functional HREs, we first identified 33 bp stretches that contained an [A/G]CGT core in the EGLN3 genomic fragment. This analysis resulted in a list of 124 putative hypoxia-responsive sequences. We then calculated the score for each sequence by comparison with the position-specific frequency matrix (see the Materials and methods section for details) and sorted each putative responsive sequence according to its value. Since the hypoxic response of EGLN3 is conserved in rodent cells, we reasoned that the hypoxia-responsive sequence in the human EGLN3 locus should be conserved in the equivalent mouse locus. Thus we also searched for sequences containing HREs along 32 kb of the mouse EGLN3 genomic region (*Mus musculus* chromosome 12 genomic contig NT_039551.3, gi 5176690: 13190000–13158000) in the same manner as for the human sequence. We identified 129 putative murine HREs from this genomic fragment. In order to determine whether any of the putative HREs was conserved between human and mouse, we compared them using the BLAST 2 SEQUENCES program [42]. Instead of comparing each one of the 124 putative human HREs with all the 129 putative mouse HREs, we concatenated all human HREs in a single artificial sequence and compared it with the concatenated mouse HREs in a single step (Figure 2B). Only five sequences were conserved between the two species (Figures 2B

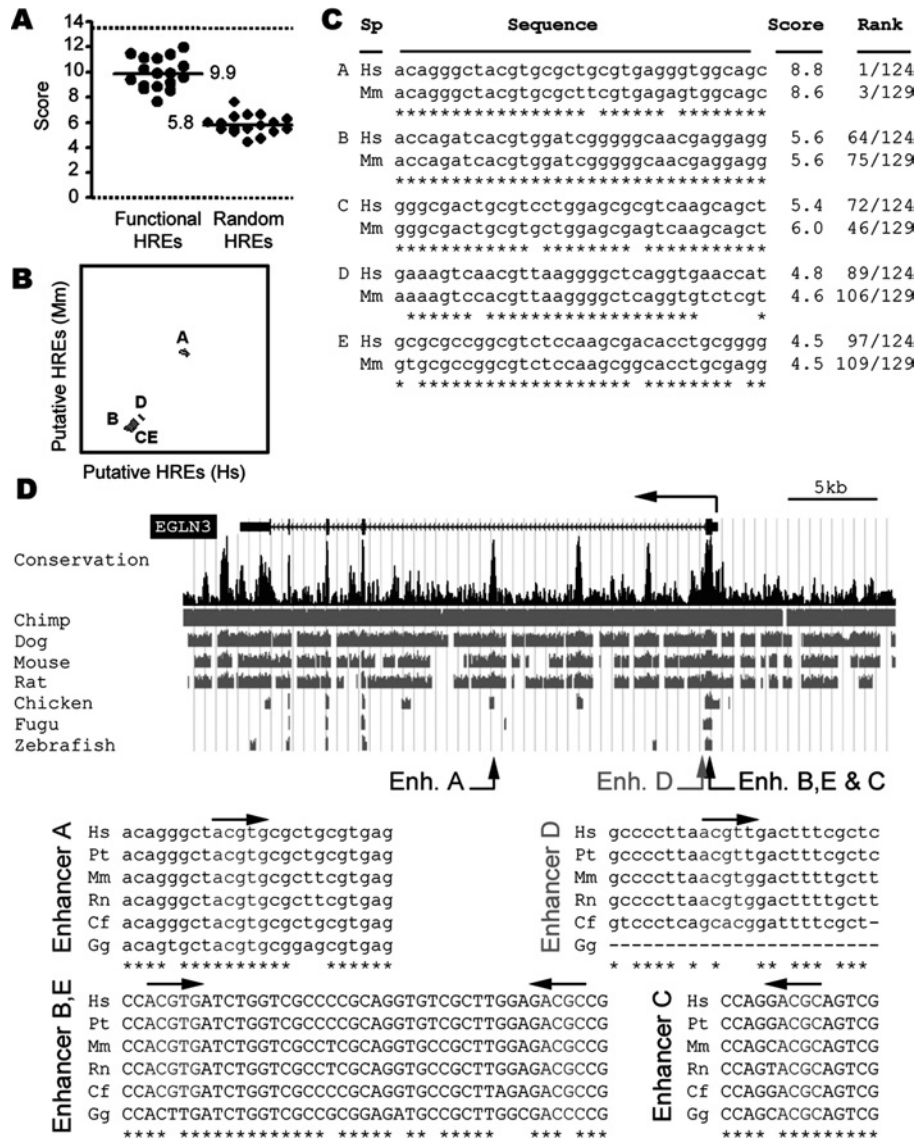


Figure 2 Computer identification of HRE in the EGLN3 locus

(A) The data represent the scores obtained by comparing the sequences from VEGF-A, BNIP3, P4H α , ROR4 α , c-Met, PGK1, Glut-1, promoters (functional HREs; ●) or from random sequences containing a core [A/G]CGT motif (random HREs; ▲), to the position-specific frequency matrix. The horizontal line represents the mean value for each group of data and the number represents its value. The difference between their means was statistically significant ($P < 0.001$, t test). (B) BLAST comparison of the concatenated 124 putative HRE sequences found in the human 40 kb EGLN3 genomic region versus the concatenated 129 sequences found for the mouse locus. (C) Alignment of the five HRE sequences identified in (B) that are conserved between human (Hs) and mouse (Mm). The score for each sequence, according to the position-specific frequency matrix, as well as their rank, is shown. (D) Genomic region of the EGLN3 locus (adapted from UCSD Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>). Boxes are open reading frames. The size of the box indicates whether it is UTR or CDS, as indicated in Figure 1. The arrow indicates the direction of transcription. The EGLN3 gene structure, including transcription start site, is based on RefSeq NM_022073. Conservation of sequences among different species is indicated by the black histogram, and the individual homology between different species and human is indicated by grey histograms. The localization of enhancers A–D in the EGLN3 genomic region is indicated by arrows. The sequence conservation of the five putative enhancers between different species is shown; the arrows above the HREs indicate their direction.

and 2C), and these were named enhancers A–E in decreasing order of the scores obtained for each (Figure 2C).

Of these five putative hypoxia-responsive sequences conserved between human and mouse, only enhancer A reached a score similar to that found for other functional HREs (Figures 2C and 2A). In addition, enhancer A had the highest score of all the putative HREs found in the EGLN3 genomic region (Figure 2C). The other four sequences (enhancers B–E) had a score that was significantly below that of the functional HREs (Figures 2A and 2C; $P < 0.01$). We examined the genomic location of these sequences, as well as their conservation across a broad range of

species (Figure 2D). Three of the five putative HREs (enhancers B, C and E) were located in the coding sequence of the first exon of human EGLN3 (at positions +563, +453 and +528 respectively), while the other two conserved regions were situated in the first intron of human EGLN3 (enhancer D at +870 bp and enhancer A at +12588 bp), downstream of the transcription initiation site (Figure 2D). Significantly, enhancers A and D were located in a long 400 bp conserved region and such regions, called CNS (conserved non-coding sequences), often correspond to dispersed transcriptional regulatory elements [43].

Closer analysis of the evolutionary conservation of the putative HREs (Figure 2D) revealed that the sequence located at +12 kb (enhancer A) was highly conserved throughout evolution from birds to humans. In contrast, despite being located in a CNS, the core of the HRE located at +870 (enhancer D) was not conserved in dog or chicken (Figure 2D). Since the other three sequences (enhancers B, C and E) were located in the coding sequence of EGLN3, their conservation might reflect the need to maintain the protein structure of EGLN3 rather than a conserved regulatory function. Even so, the core HRE of enhancers B and E was not conserved in chicken (Figure 2D).

In summary, through this bioinformatics approach, we identified an evolutionarily conserved region (enhancer A) containing a putative hypoxia-inducible sequence in the first intron of the EGLN3 gene.

Enhancer A is up-regulated by hypoxia in an HRE-dependent manner

In order to probe the functionality of enhancer A, we cloned the sequence +12411 to +12836 (containing the CNS) from the human EGLN3 gene upstream of a minimal promoter to drive luciferase expression in a reporter construct (Figure 3A). The expression of luciferase from this construct was strongly induced under hypoxic conditions, increasing by a mean of 11.9-fold (Figure 3B, $P < 0.001$ when comparing normoxic versus hypoxic values). In contrast, the other putative HRE-containing sequences derived from the EGLN3 genomic region (Figure 3A), such as enhancer D (+738 to +1099; Enh.D), those located in the promoter regions (-1685 to -1418 and -2298 to -1418; Prom.1 and Prom.2 respectively), and those from the coding sequence (enhancers B, C and E) were unable to induce luciferase expression in response to hypoxia (Figure 3B and results not shown). To confirm that the induction in response to hypoxia observed with the enhancer A construct was mediated by the putative HRE in this sequence, we generated a mutant construct in which the central ACGT core was mutated to TAGC (Enh. A*). This mutant construct was no longer able to induce luciferase expression in hypoxic conditions (Figure 3B). Thus these results indicate that enhancer A contains a functional HRE.

We therefore examined whether enhancer A was able to drive hypoxic gene expression in the context of its natural relative location. Hence, we cloned the enhancer A sequence into the pGL3-E3P3.5 construct (Figure 1A), downstream of the luciferase gene (Figure 3C). Reporter assays with this construct revealed that enhancer A was able to increase luciferase expression in response to hypoxia (a mean of 2.4-fold, $P < 0.001$) regardless of its position relative to the promoter (Figure 3C). Furthermore, in these experiments, enhancer A increased transcription from the natural EGLN3 promoter.

HIF1 α binds to the enhancer A sequence *in vivo*

For the enhancer A sequence identified to be a true HRE, it must be recognized by HIF *in vivo*. To test this possibility, we performed ChIP experiments on HeLa cells grown under normoxic or hypoxic (1% oxygen) conditions (Figure 4). After treatment, chromatin was immunoprecipitated with anti-HIF1 α antibodies and the bound DNA was identified by PCR amplification with primers specific for enhancer A (primers 6 and 7, Table 1), enhancer D (primers 8 and 9, Table 1) or the hypoxia-induced region of the P4H α (primers 15 and 16, Table 1) as a control. Under hypoxic conditions, endogenous HIF1 α bound to the HREs in enhancer A and the P4H α promoter, but not to that in enhancer D (Figure 4). Moreover, both in the case of the control

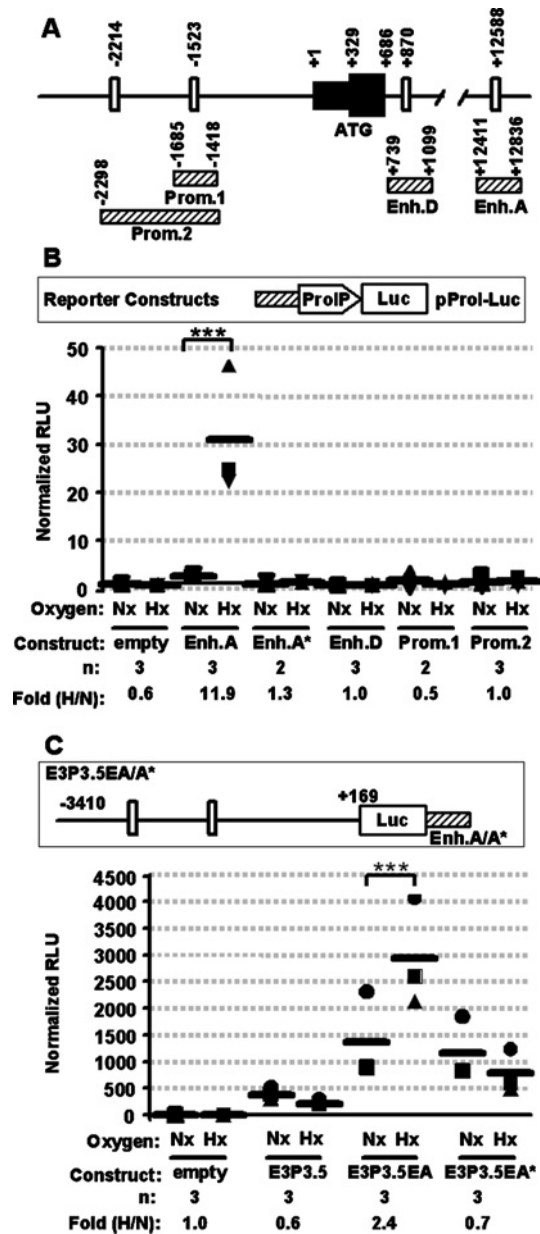


Figure 3 Enhancer A is induced by hypoxia

(A) Diagram of the *H. sapiens* EGLN3 genomic region in which the numbers indicate nucleotide positions relative to the transcription initiation site, as shown in Figure 1. The indicated regions (hatched boxes) containing putative hypoxia-responsive sequences were cloned into the pProI plasmid upstream of the rat minimal prolactin promoter. (B) HeLa cells were transfected with the fragments from the EGLN3 genomic region indicated, cloned upstream of a minimal promoter (open pointed box). A diagram of the constructs is depicted in the Figure, in which the hatched box represents any of the elements from Figure 3(A). After transfection, the cells were cultured under normoxic (Nx) conditions or in an atmosphere of 1% oxygen (Hx) for 24 h before analysing the luciferase activity. Enh. A* is a reporter construct derived from enhancer A (Enh. A) in which the core ACGT was mutated to TAGC. The data are presented as indicated in Figure 1. (C) The enhancer A sequence, or its mutated form, was cloned into pGL3-E3P3.5 (see Figure 1A) downstream of the firefly luciferase gene as depicted in the Figure (hatched box). HeLa cells were transfected with the indicated constructs and treated as in (B). The data are presented as indicated in Figure 1.

P4H α promoter and that of enhancer A, HIF1 α binding was strongly diminished under normoxic conditions (Figure 4). These results suggested that enhancer A is indeed a functional regulatory sequence that responds to hypoxia *in vivo*.

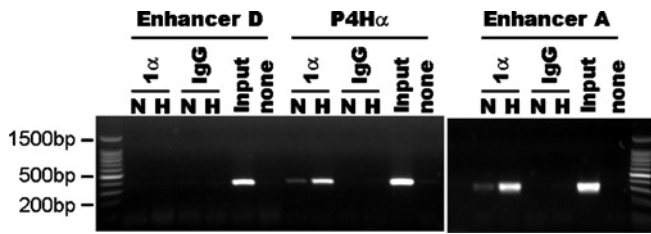


Figure 4 HIF1 α binds to enhancer A *in vivo*

HeLa cells were cultured under normoxic (N) or hypoxia (H) conditions for 12 h and then fixed to cross-link proteins to DNA. Cells were lysed and their DNA fragmented by sonication. Cell lysates were then immunoprecipitated with control IgGs (IgG) or a polyclonal antiserum raised against HIF1 α (1 α). Co-immunoprecipitated DNA was then amplified by PCR with primers specific for enhancer A (primers 6 and 7, Table 1), enhancer D (primers 8 and 9, Table 1) or collagen proline-4 hydroxylase α promoter (P4H α ; primers 15 and 16, Table 1). Input, sample of fragmented genomic DNA before immunoprecipitation. None, PCR without template. The experiment was repeated three times yielding similar results.

HIF is necessary and sufficient to induce enhancer A

It is known that the induction of EGLN3 by hypoxia is mediated by HIF [20,22]. The results we presented above suggest that enhancer A located at +12 kb inside the first intron of the EGLN3 gene was the regulatory region responsible for the induction of EGLN3 in response to hypoxia. Therefore we studied whether HIF α was necessary to induce enhancer A-mediated transcription by analysing the response to hypoxia of constructs driven by enhancer A in Ka13 Chinese-hamster ovary cells. These cells are deficient in HIF activity due to their incapacity to express the HIF1 α and HIF2 α genes [24]. For comparison, these constructs were also transfected into a Ka13-derived cell line, 4.5 cells, in which the HIF deficit is complemented by the expression of HIF1 α . [24]. Of these lines, the activity of enhancer A was only induced by hypoxia in the 4.5 cells that expressed functional HIF (Figure 5A). We then determined whether HIF was sufficient to induce enhancer A by transfecting HeLa cells with the enhancer A reporter constructs in combination with a plasmid encoding an oxygen-independent HIF1 α construct. This mutant HIF is resistant to oxygen-mediated degradation due to the mutation of Pro⁴⁰² and Pro⁵⁶⁴ to Ala. [20]. HIF1 α expression was sufficient to induce wild-type enhancer A activity under con-

ditions of normoxia, but not the activity of the HRE-mutant enhancer A construct (Figure 5B). Similar results were obtained with constructs where enhancer A was situated downstream of the firefly luciferase reporter gene (results not shown). Thus HIF1 α did appear to be necessary and sufficient to induce EGLN3 enhancer activity.

DISCUSSION

The adaptive response to hypoxia mediated by HIF involves the induction of a large number of genes, including those required for anaerobic glycolysis and angiogenesis. HIF also mediates the induction of EGLN1 and EGLN3, both involved in its regulation, which is indicative of the existence of a negative feedback loop to maintain strict control over HIF activity.

Here, we describe the identification of an evolutionarily conserved enhancer sequence responsible for the hypoxia-mediated induction of EGLN3. Interestingly, this enhancer was located in the first intron of the EGLN3 gene, more than 12 kb downstream the transcription initiation site. It is well known that enhancers are capable of influencing transcription at such a distance from the promoter, regardless of their relative position with respect to the transcription initiation site (upstream or downstream). However, this is unusual among hypoxia-regulated genes in which most of the HREs described lie in the promoter region of the gene regulated, usually within 1 kb of the transcription initiation site. An important exception is the hypoxia-inducible sequence of the erythropoietin gene that is located in its 3'-UTR (3'-untranslated region) at 3 kb downstream of the transcription initiation site [32]. Many models for 'action at a distance' have been proposed [44]. In most of the cases, it is supposed that the DNA between the enhancer and the promoter loops out to allow the activator proteins bound to the enhancer to come into contact with proteins (including the general transcription machinery) bound to the promoter. In fact, this model has been described for the Epo gene [45]. The binding of Sp1 and Smad3 transcription factors to Epo promoter is required for efficient hypoxic induction through the HRE located at the 3'-UTR gene region. This co-operation is due to physical interaction between these transcription factors and HIF1 α . The physical contact between the upstream promoter and the 3' downstream enhancer is mediated by Sp1 and Smad3 factors, and would occur upon bending of the DNA intervening sequences [45]. Hence, a similar mechanism might explain the

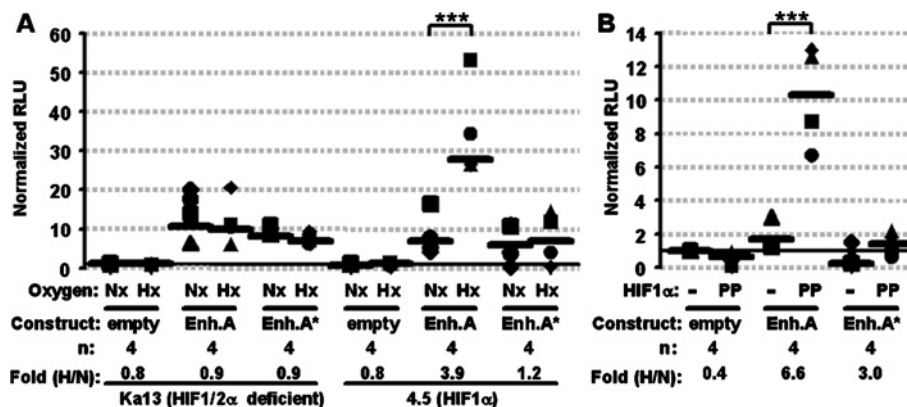


Figure 5 HIF α is necessary and sufficient to induce enhancer A activity

(A) HIF1 α -deficient Ka13 cells or HIF1 α -competent 4.5 cells were transfected with the constructs indicated (see Figure 3A for details). After transfection, the cells were cultured under normoxic conditions (Nx) or in an atmosphere of 1% oxygen (Hx) for 24 h before analysing the luciferase activity. Results are represented as indicated in Figure 1. (B) HeLa cells were transfected with the indicated constructs derived from enhancer A (see Figure 3A for details) together with a plasmid encoding a stable HIF construct (HIF PP). After transfection, the cells were cultured under normoxic conditions for 48 h before analysing the luciferase activity. Results are represented as indicated in Figure 1.

regulation of the EGLN3 gene by HIF acting through the enhancer described herein.

Although we cannot rule out the possibility that other sequences exist which control the induction of EGLN3 by hypoxia, the one described here is likely to be functionally relevant because endogenous HIF1 α binds to it *in vivo* in an oxygen-dependent manner (Figure 4). In agreement with our data (Figure 1), a region upstream of the transcription initiation site of the Sm20 gene, the rat orthologue of the EGLN3, was shown to have promoter activity dependent on Sp1/Sp3 sites [23]. Moreover, a negative regulatory region was observed between -3800 and -1100 of the rat promoter that seems to be conserved in the human promoter (Figure 1). However, while Sm20 (EGLN3) is known to be induced by hypoxia in rat cells [21], how this promoter is regulated by hypoxia and whether functional hypoxia-inducible sequences exist is still unclear [23]. Thus our results are the first to explain the mechanism behind EGLN3 induction at low oxygen tensions and constitutive HIF activity.

The atypical location of the HRE within the EGLN3 locus, and its distance from the transcription initiation site, made its identification difficult by conventional biological approaches. The successful identification of a hypoxia-regulated sequence by adopting a bioinformatics approach corroborates the power of these strategies in the search for regulatory regions in genomic sequences. We first generated a quantitative consensus sequence (position-specific frequency matrix) through the alignment of several hypoxia-regulated sequences. This consensus allowed us, not only to identify putative HREs, but also to sort them according to their similarity to known functional HREs. We then investigated the evolutionary conservation of these putative HREs since the evolutionary conservation of regulatory sequences is of paramount importance to identify biologically relevant regulatory sequences [43]. Here, the combination of both approaches resulted in the identification of a functional HRE. Significantly, the position-specific frequency matrix described in this work might aid in the future identification of hypoxia-regulated regions in other genes.

One further conclusion from our work is that the core HRE ([A/G]CGT) is necessary, but not sufficient, to confer oxygen sensitivity. This is supported by the fact that several sequences containing this core were not able to drive luciferase expression in response to hypoxia (Figure 3) or to bind HIF1 α *in vivo* (Figure 4 and results not shown). These results are in agreement with previous studies of other hypoxia-inducible promoters [30]. Therefore sequence requirements other than the core HRE are probably required for the efficient recruitment of HIF1 α . This might explain why the alignment of functional HREs showed that, in addition to the [A/G]CGTG core, the frequency of nucleotides at other specific positions was significantly greater than that expected by chance. Conserved sequences other than the core HRE in hypoxia-inducible sequences have been identified previously [37,46], although these often differed and do not match with that described here. Nevertheless, it is probable that, in addition to the HIF-binding site, these conserved sequences play a major role in HIF-mediated transcription. In agreement with this, mutation of these abolishes the hypoxic response of the isolated regulatory sequences [37,46]. Finally, the conservation of residues might also indicate that factors other than HIF are required for hypoxic induction of these sequences. In fact, for some genes, it has been shown that the binding of transcription factors such as AP-1 [47] or Sp1 [37] is required for the HIF-mediated response to hypoxia.

In summary, we have identified, by a combination of bioinformatics and biological approaches, a CNS in the first intron of the EGLN3 gene that binds HIF1 α *in vivo* and drives transcription

in vitro in response to hypoxia. Thus we conclude that this enhancer region, located 12 kb downstream of the transcription initiation site, is responsible for the HIF-mediated hypoxic induction of EGLN3.

We thank M. J. Calzada and E. Temes for a critical reading of this paper and for their valuable suggestions. This work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS01/0264 to L. P.), Comunidad Autónoma de Madrid (08.3/0034.1/2001 to L. P.), Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2002-02344 to L. P. and SAF 2001-0215 to M. O. L.) and by the Red Cardiovascular (RECAVA).

REFERENCES

- 1 Wenger, R. H. (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* **16**, 1151-1162
- 2 Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. and Semenza, G. L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5510-5514
- 3 Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 4273-4278
- 4 Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. and Harris, A. L. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* **157**, 411-421
- 5 Stroka, D. M., Burkhardt, T., Desbaillets, I., Wenger, R. H., Neil, D. A., Bauer, C., Gassmann, M. and Candinas, D. (2001) HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* **15**, 2445-2453
- 6 Sowter, H. M., Raval, R., Moore, J., Ratcliffe, P. J. and Harris, A. L. (2003) Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif-1{ α } versus Hif-2{ α } in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res.* **63**, 6130-6134
- 7 Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L. A., Keith, B. and Simon, M. C. (2003) Differential roles of hypoxia-inducible factor 1{ α } (HIF-1{ α }) and HIF-2{ α } in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9361-9374
- 8 Masson, N. and Ratcliffe, P. J. (2003) HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. *J. Cell Sci.* **116**, 3041-3049
- 9 Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiano, J., Ohn, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S. and Kaelin, Jr, W. G. (2001) HIF1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464-468
- 10 Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J. et al. (2001) Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-472
- 11 Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. and Ratcliffe, P. J. (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-1 α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* **20**, 5197-5206
- 12 Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A. et al. (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell (Cambridge, Mass.)* **107**, 43-54
- 13 Bruick, R. K. and McKnight, S. L. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337-1340
- 14 Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J. and Whitelaw, M. L. (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* **295**, 858-861
- 15 Hewitson, K. S., McNeill, L. A., Riordan, M. V., Tian, Y. M., Bullock, A. N., Welford, R. W., Elkins, J. M., Oldham, N. J., Shoumo, B., Gleadle, J. M. 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**, 26351-26355
- 16 Hirsilä, M., Koivunen, P., Günzler, V., Kivirikko, K. I. and Myllyharju, J. (2003) Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor HIF. *J. Biol. Chem.* **278**, 30772-30780
- 17 Wenger, R. H. and Gassmann, M. (1997) Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol. Chem.* **378**, 609-616
- 18 Metzzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J. H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, Q. W., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W. et al. (2002) Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J. Cell Sci.* **116**, 1319-1326

- 19 Berra, E., Richard, D. E., Gothie, E. and Pouyssegur, J. (2001) HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Lett.* **491**, 85–90
- 20 del Peso, L., Castellanos, M. C., Temes, E., Martin-Puig, S., Cuevas, Y., Olmos, G. and Landazuri, M. O. (2003) The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J. Biol. Chem.* **278**, 48690–48695
- 21 Naranjo-Suárez, S., Castellanos, M. C., Alvarez-Tejado, M., Vara, A., Landazuri, M. O. and del Peso, L. (2003) Downregulation of hypoxia inducible factor-2 in PC12 cells by nerve growth factor stimulation. *J. Biol. Chem.* **278**, 31895–31901
- 22 Marxsen, J. H., Stengel, P., Doege, K., Heikkinen, P., Jokilehto, T., Wagner, T., Jelkmann, W., Jaakkola, P. and Metzén, E. (2004) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem. J.* **381**, 761–767
- 23 Menzies, K., Liu, B., Kim, W. J., Moschella, M. C. and Taubman, M. B. (2004) Regulation of the SM-20 prolyl hydroxylase gene in smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 801–810
- 24 Wood, S. M., Wiesener, M. S., Yeates, K. M., Okada, N., Pugh, C. W., Maxwell, P. H. and Ratcliffe, P. J. (1998) Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 α -subunit (HIF-1 α). Characterization of hif-1 α -dependent and -independent hypoxia-inducible gene expression. *J. Biol. Chem.* **273**, 8360–8368
- 25 Aragonés, J., Jones, D. R., Martin, S., San Juan, M. A., Alfranca, A., Vidal, F., Vara, A., Merida, I. and Landazuri, M. O. (2001) Evidence for the involvement of diacylglycerol kinase in the activation of hypoxia-inducible transcription factor 1 by low oxygen tension. *J. Biol. Chem.* **276**, 10548–10555
- 26 Liu, Y., Cox, S. R., Morita, T. and Kourembanas, S. (1995) Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* **77**, 638–643
- 27 Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S. and Goldberg, M. A. (1995) Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **270**, 13333–13340
- 28 Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D. and Semenza, G. L. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4604–4613
- 29 Semenza, G., Roth, P., Fang, H. and Wang, G. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **269**, 23757–23763
- 30 Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. and Giallongo, A. (1996) Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**, 32529–32537
- 31 Firth, J. D., Ebert, B. L., Pugh, C. W. and Ratcliffe, P. J. (1994) Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 6496–6500
- 32 Beck, I., Ramirez, S., Weinmann, R. and Caro, J. (1991) Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J. Biol. Chem.* **266**, 15563–15566
- 33 Blanchard, K. L., Acquaviva, A. M., Galson, D. L. and Bunn, H. F. (1992) Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5373–5385
- 34 Semenza, G. L. and Wang, G. L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5447–5454
- 35 Madan, A. and Curtin, P. T. (1993) A 24-base-pair sequence 3' to the human erythropoietin gene contains a hypoxia-responsive transcriptional enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3928–3932
- 36 Lee, P. J., Jiang, B. H., Chin, B. Y., Iyer, N. V., Alam, J., Semenza, G. L. and Choi, A. M. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 5375–5381
- 37 Miki, N., Ikuta, M. and Matsui, T. (2004) Hypoxia-induced activation of the retinoic acid receptor-related orphan receptor $\{\alpha\}$ 4 gene by an interaction between hypoxia-inducible factor-1 and Sp1. *J. Biol. Chem.* **279**, 15025–15031
- 38 Ebert, B. L., Firth, J. D. and Ratcliffe, P. J. (1995) Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct cis-acting sequences. *J. Biol. Chem.* **270**, 29083–29089
- 39 Takahashi, Y., Takahashi, S., Shiga, Y., Yoshimi, T. and Miura, T. (2000) Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase α (I) in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 14139–14146
- 40 Bruick, R. K. (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 9082–9087
- 41 Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S. and Comoglio, P. M. (2003) Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* **3**, 347–361
- 42 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410
- 43 Nardone, J., Lee, D. U., Ansel, K. M. and Rao, A. (2004) Bioinformatics for the 'bench biologist': how to find regulatory regions in genomic DNA. *Nat. Immunol.* **5**, 768–774
- 44 Cook, P. R. (2003) Nongenetic transcription, gene regulation and action at a distance. *J. Cell Sci.* **116**, 4483–4491
- 45 Sanchez-Elsner, T., Ramirez, J. R., Sanz-Rodriguez, F., Varela, E., Bernabeu, C. and Botella, L. M. (2004) A cross-talk between hypoxia and TGF- β orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J. Mol. Biol.* **336**, 9–24
- 46 Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M. and Esumi, H. (2001) Identification of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **276**, 2292–2298
- 47 Damert, A., Ikeda, E. and Risau, W. (1997) Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem. J.* **327**, 419–423

Received 21 December 2004/7 April 2005; accepted 11 April 2005

Published as BJ Immediate Publication 12 April 2005, doi:10.1042/BJ20042121