

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCENCIAS**  
**MOLECULARES**  
FACULTAD DE MEDICINA



Universidad Autónoma  
de Madrid

**PAPEL DEL TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS  
LAT1 EN ERITROPOYESIS Y SU REGULACIÓN POR EL  
FACTOR DE RESPUESTA A HIPOXIA HIF2 $\alpha$**

TESIS DOCTORAL

**ANTONIO BOUTHELIER DE PEDRO**

Madrid 2021

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCENCIAS**  
**MOLECULARES**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA



Universidad Autónoma  
de Madrid

**PAPEL DEL TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS LAT1 EN**  
**ERITROPOYESIS Y SU REGULACIÓN POR EL FACTOR DE**  
**RESPUESTA A HIPOXIA HIF2 $\alpha$**

Tesis doctoral presentada por

**Antonio Bouthelier de Pedro**

Graduado en biología para optar al título de Doctor por la  
Universidad Autónoma de Madrid

**Doctorado en Biociencias Moleculares**

Director de tesis:

**Dr. Julián Aragonés López**

Universidad Autónoma de Madrid  
Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa

Madrid, 2021



El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Antonio Bouthelier de Pedro, bajo la dirección del Dr. Julián Aragonés López en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Santa Cristina (Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa IIS-IP, Hospital Universitario La princesa), Universidad Autónoma de Madrid.

Opta al título de Doctor

**Antonio Bouthelier de Pedro**

VºBº del Director de Tesis

Dr. Julián Aragonés López

***A mis padres y hermano***



# AGRADECIMIENTOS

# AGRADECIMIENTOS

---

Disponible solo en formato impreso.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>19</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>23</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>27</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>31</b>
1. Adaptación celular a la hipoxia.....	33
1.1. Factores de Transcripción Inducibles por Hipoxia (HIF) .....	33
1.2. Diferencias funcionales entre las isoformas HIF1 $\alpha$ y HIF2 $\alpha$ .....	36
1.3. HIF2 $\alpha$ como activador de la proliferación autónoma de célula.....	37
1.4. Diferencias de las regiones N y C-terminales presentes en HIF1 $\alpha$ y HIF2 $\alpha$ .....	40
2. Metabolismo de aminoácidos.....	42
2.1. Aminoácidos y mTORC1 .....	42
2.2. El transportador de aminoácidos LAT1/CD98 (SLC7A5/SLC3A2).....	44
2.3. Distribución tisular y mecanismos implicados en la inducción de LAT1/CD98 ....	45
3. Eritropoyesis .....	48
3.1. Diferenciación eritroide.....	48
3.2. Regulación de la eritropoyesis por la isoforma HIF2 $\alpha$ .....	51
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
1. Líneas celulares, medios de cultivo y reactivos .....	61
2. Construcciones de plásmidos de ADN .....	61
3. Infecciones lentivirales .....	62
4. Inmunodetección de proteínas por Western Blot .....	63
5. Extracción de ARN y PCR en tiempo real.....	63
6. Modelos animales .....	64
7. Análisis hematológicos .....	67
8. Citometría de flujo .....	67
9. Inmunodetección de EPO por ELISA.....	68
10. Análisis estadístico.....	68
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
<b>PARTE I</b>	

1. Papel de las regiones N-terminal y C-terminal de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en la especificidad de su actividad transcripcional ..... 73
2. Actividad transcripcional específica de las isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  *in vivo* ..... 78

## PARTE II

1. Expresión basal del transportador de aminoácidos LAT1/CD98 en células del linaje eritroide.....	83
2. LAT1/CD98 en progenitores eritroides esplénicos en condiciones de estrés eritropoyético (modelos de anemia).....	88
2.1. Expresión de LAT1/CD98 en progenitores eritroides esplénicos en condiciones de estrés eritropoyético.....	91
3. Expresión de LAT1/CD98 en progenitores eritroides circulantes en condiciones de estrés eritropoyético .....	95
4. HIF2 $\alpha$ no controla la inducción de LAT1 en el linaje eritroide .....	99
5. La ausencia de LAT1 en el linaje eritroide promueve un escenario de hipereritropoyetinemia.....	102
6. La deficiencia de LAT1 en el linaje eritroide disminuye el tamaño de las células rojas circulantes .....	104
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>125</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>155</b>

# RESUMEN

La respuesta celular a la hipoxia está fundamentalmente controlada por los factores de respuesta a hipoxia HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ . En particular la isoforma HIF2 $\alpha$  - pero no HIF1 $\alpha$  - se ha implicado en promover proliferación celular en respuesta a hipoxia en ciertos escenarios biológicos. Uno de los genes implicados en esta respuesta proliferativa es el transportador de aminoácidos LAT1 (SLC7A5). Este transportador es un heterodímero compuesto por LAT1 - cuya expresión es inducida transcripcionalmente por la isoforma HIF2 $\alpha$  - unido a la subunidad CD98. En primer lugar - con el fin de estudiar en que región de HIF2 $\alpha$  podría localizarse esta especificidad para inducir SLC7A5 - generamos proteínas quiméricas de los factores de transcripción HIF en las que los dominios de unión a ADN/heterodimerización de HIF1 $\alpha$  se fusionaron al dominio de transactivación de HIF2 $\alpha$  y viceversa. Observamos que el dominio de transactivación de HIF2 $\alpha$  es más relevante para la inducción de genes dependientes de HIF2 $\alpha$  como el transportador de aminoácidos SLC7A5. Por otro lado, la inducción de los genes dependientes de HIF1 $\alpha$  en células WT8, como CAIX y BNIP3 es más dependiente de ambas regiones tanto la de unión a ADN/heterodimerización como la de transactivación.

Al margen de esta caracterización de naturaleza más molecular, nos planteamos la posible participación del eje HIF2 $\alpha$ -LAT1 en eritropoyesis teniendo en cuenta que una respuesta proliferativa bien conocida a la hipoxia es la expansión de los precursores eritroides con el fin de elevar la oxigenación sanguínea en condiciones de hipoxia. En este trabajo hemos demostrado que el heterodímero LAT1/CD98 se expresa en condiciones basales en precursores eritroides en el bazo, así como en reticulocitos circulantes, pero no en eritrocitos maduros. Además, la expresión de LAT1/CD98 en precursores eritroides se induce en diferentes modelos de anemia tales como el tratamiento con fenilhidrazina o flebotomía, aunque esta inducción no depende de la isoforma HIF2 $\alpha$ . Para conocer el papel de LAT1 (SLC7A5) en eritropoyesis generamos ratones deficientes en *Slc7a5* específicamente en el linaje eritroide para ser analizados tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés eritropoyético asociado a la anemia. Los resultados indican que los animales deficientes en *Slc7a5* en el linaje eritroide no presentan deficiencias en número de células rojas circulantes, pero si una disminución del tamaño y el volumen corpuscular medio generándose una disminución del hematocrito. En esta misma línea la deficiencia de LAT1 (SLC7A5) disminuye los niveles de hemoglobina circulante, así como de la hemoglobina corpuscular media. Estas alteraciones de las células rojas circulantes presentan consecuencias funcionales ya que estos ratones muestran niveles elevados de eritropoyetina (EPO)

circulante (hiper-eritropoietinemia) lo que parece ser un signo de compensación a la hipoxemia derivada del menor tamaño y contenido en hemoglobina de las células rojas circulantes tras la inactivación de *S/c7a5* en el linaje eritroide.

Por lo tanto, nuestros estudios han desvelado un nuevo papel fisiopatológico de LAT1, aspecto que permanece aún bastante desconocido ya que una gran mayoría de los estudios sobre LAT1 se han circunscrito a su papel en proliferación autónoma de células tumorales y la biología del cáncer. Por último, consideramos que este estudio podría generar nuevas perspectivas clínicas para el tratamiento de la anemia y en particular aquellas que limitan el tamaño de los eritrocitos como es el caso de la anemia microcítica.



# **ABSTRACT**

## ABSTRACT

---

Cellular response to hypoxia is largely controlled by the hypoxia-inducible transcription factors HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ . In particular, HIF2 $\alpha$  - but not HIF1 $\alpha$  - isoform drives cellular proliferation in some particular biological settings when oxygen becomes limited. The amino acid carrier LAT1 (SLC7A5) has been involved in this proliferative response. This amino acid carrier is composed by LAT1 - that is transcriptionally induced by the HIF2 $\alpha$  isoform - and the CD98 subunit. In order to investigate which HIF2 $\alpha$  region is required to explain its specific effect on *SLC7A5* we generated chimeric proteins of the HIF transcription factors where HIF1 $\alpha$  (or HIF2 $\alpha$ ) DNA binding/heterodimerization domain were fused to HIF2 $\alpha$  (or HIF1 $\alpha$ ) transactivation domain. We show that HIF2 $\alpha$  transactivation domain is more relevant to promote HIF2 $\alpha$ -dependent gene transcription including the induction of *SLC7A5* (LAT1). In contrast HIF1 $\alpha$ -dependent specific induction of genes such as *CAIX* or *BNIP3* is more dependent of both binding/heterodimerization and transactivation domains of HIF1 $\alpha$ .

In addition to this molecular characterization, we also assessed the possible role of HIF2 $\alpha$ -LAT1 molecular axis in erythropoiesis taking into account that this biological process requires the proliferation of erythroid precursors to increase tissue oxygenation in hypoxic conditions. In this study we first demonstrate that LAT1/CD98 heterodimer is expressed in splenic erythroid precursors as well as in circulating reticulocytes, but not in mature erythrocytes. Moreover, surface LAT1/CD98 expression in erythroid precursors is further induced in anemic conditions induced by phenylhydrazine treatment or phlebotomy. Erythrocyte *Slc7a5*-deficient mice do not show differences in the number of circulating red blood cells in baseline or in anemic conditions when compared with control mice. However, circulating red blood cells in these mice are smaller with a reduced mean corpuscular volume leading to reduced hematocrit. Moreover, erythroid LAT1 (*SLC7A5*) deficiency reduces circulating hemoglobin as well as mean corpuscular hemoglobin. As a consequence, erythrocyte *Slc7a5*-deficient mice have elevated levels of circulating erythropoietin (EPO), which can be considered as a chronic compensation to the hypoxemia derived from the dysfunctional (smaller) circulating erythrocytes.

Overall, our studies reveal a new physiopathological role of LAT1, an aspect that is relevant taking into consideration that the vast majority of studies about LAT1 were restricted to its role in cancer biology. Finally, we consider that this study might generate new clinical perspectives for anemia treatment and, in particular, those that limit the size of erythrocytes such as microcytic anemia.

---

# **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

---

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNT:** *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*, traslocador nuclear del receptor para aril hidrocarburos

**BFU-E:** *Burst-forming units-erythroid*, unidades formadoras de ráfagas eritroides

**bHLH:** *basic helix-loop-helix*, hélice-bucle-hélice básico

**BNIP3:** *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*

**CAIX:** *Carbonic Anhydrase IX*, anhidrasa carbónica IX

**CBP:** *cre Binding Protein*, proteína de unión a cre

**CCND1/2:** Ciclina D1/2

**ccRCC:** *clear cell Renal Cell Carcinoma*, carcinoma renal de célula clara

**CD71:** *Cluster of differentiation 71*, cúmulo de diferenciación 71

**CFU-E:** *Colony-forming units-erythroid*, unidades formadoras de colonias eritroides

**CMP:** *Common myeloid progenitor*, precursor mielóide común

**CTAD:** *C-terminal transactivation domain*, dominio de transactivación C-terminal

**DMT1:** *Divalent metal transporter 1*, transportador de metales divalentes 1

**ELISA:** *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

**EPO:** Eritropoyetina

**EPOR:** *Erythropoietin receptor*, receptor de eritropoyetina

**FIH:** *Factor inhibiting HIF*, factor de inhibición de HIF

**FSC:** *Forward scatter*, dispersión delantera

**GFP:** *Green Fluorescent Protein*, proteína fluorescente verde

**GLUT1:** *Glucose transporter 1*, transportador de glucosa 1

**GYPA:** *Glycophorin A*, glicoforina A

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

**HRE:** *Hypoxia-Response Element*, elemento de respuesta a hipoxia

**HSC:** *Hematopoietic stem cell*, célula madre hematopoyética

**LAT1:** *large neutral amino acid transporter 1*, transportador de aminoácidos grandes neutros 1 (en el texto se refiere a la proteína)

**MCH:** *Mean corpuscular hemoglobin*, hemoglobina corpuscular media

**MCV:** *Mean corpuscular volumen*, volumen corpuscular medio

- MEP:** *Megakaryocyte–erythroid progenitor*, precursor eritroide-megacariocítico
- mTORC:** *Mammalian Target Of Rapamycin Complex*, Complejo diana de la rapamicina en mamíferos
- NDRG1:** *N-myc downstream regulated gene 1*, gen regulado por N-myc
- NTAD:** *N-terminal transactivation domain*, dominio de transactivación N-terminal
- OCT-4:** *Octamer-binding transcription factor 4*, factor de transcripción de unión de octámeros 4
- ODDD:** *Oxygen-dependent Degradation Domain*, dominio de degradación dependiente de oxígeno
- PAS:** Per- proteína del periodo circadiano, Arnt – proteína translocadora del receptor nuclear Ah, Sim – proteína *single-minded*
- PCR:** *Polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa
- PDK1:** *Pyruvate dehydrogenase kinase 1*, Piruvato deshidrogenasa quinasa 1
- PGK1:** *Phosphoglycerate kinase*, fosfoglicerato quinasa 1
- PGM1:** *Phosphoglucomutase 1*, fosfoglucomutasa 1
- PHD:** *Prolyl Hydroxylase Domain containing protein*, proteína que contiene un dominio prolil hidroxilasa
- PHZ:** *Phenylhydrazine*, fenilhidrazina
- SLC7A5:** *Solute Carrier Family 7 Member 5*, Transportador de solutos familia 7 miembro 5 (en el texto se refiere al gen)
- STAT3:** *Signal transducer and activator of transcription 3*, transductor de señal y activador de la transcripción 3
- TGFA:** *Transforming growth factor Alpha*, factor de crecimiento transformante alfa
- USF2:** *Upstream Stimulatory Factor 2*, factor estimulante aguas arriba 2
- VEGF:** *Vascular Endothelial Growth Factor*, factor de crecimiento endotelial vascular
- VHL:** *Von Hippel-Lindau*
- YAP1:** *Yes-associated protein 1*, proteína de asociación 1

# INTRODUCCIÓN

# INTRODUCCIÓN

## 1. Adaptación celular a la hipoxia.

### 1.1. Factores de Transcripción Inducibles por Hipoxia (HIF).

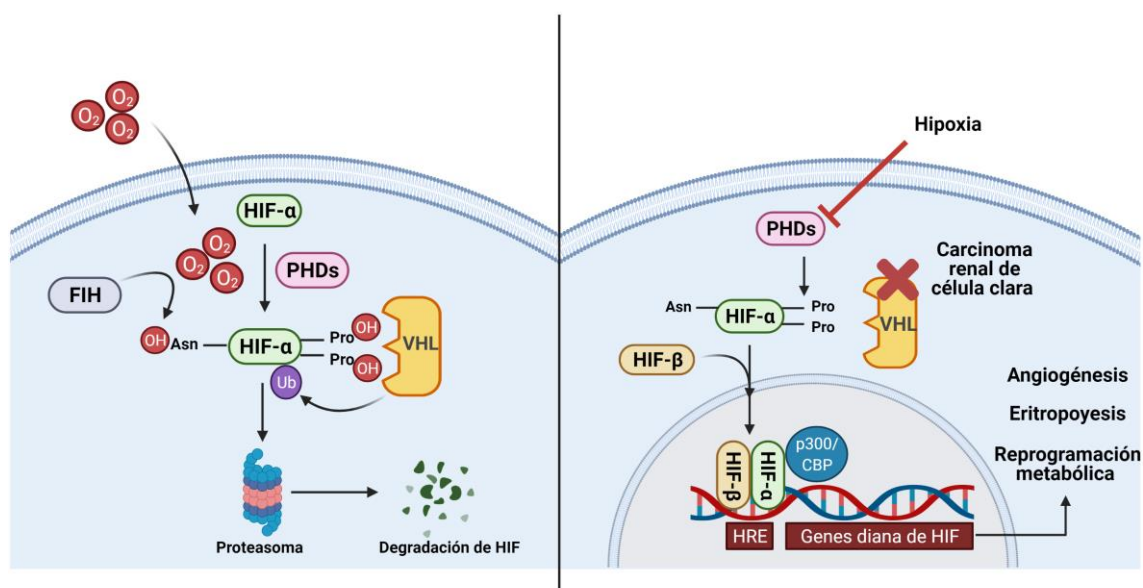
Las células pueden estar sometidas a diferentes tensiones de oxígeno a consecuencia de (i) la exposición a la altitud, donde se produce una hipoxia generalizada debido a la disminución de oxígeno atmosférico, (ii) en situaciones donde la falta de aporte de oxígeno es de carácter local (zonas internas de tumores sólidos, áreas isquémicas o depósitos de tejido adiposo) o (iii) en condiciones fisiopatológicas que cursan con una disminución de la presión parcial de oxígeno ( $PO_2$ ) arterial como anemias o enfermedades pulmonares. Por ello, las células están equipadas con sistemas de detección de oxígeno para crear una respuesta adaptativa cuando el oxígeno se encuentra limitado. Los factores inducibles por hipoxia HIF (del inglés: *hipoxia-inducible factor*) son reguladores centrales de esta respuesta celular a las fluctuaciones de oxígeno. Los factores HIFs son heterodímeros compuestos por subunidades  $\alpha/\beta$ . Se han identificado tres subunidades alfa (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y HIF3 $\alpha$ ) inducibles y una subunidad beta (HIF1 $\beta$ , también llamada receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos, ARNT) (Kaelin & Ratcliffe, 2008). Tanto las subunidades  $\alpha$  como las  $\beta$  presentan un dominio básico hélice-giro-hélice (bHLH) necesario para la unión al ADN y un dominio PER-ARNT-SIM (PAS) implicado en la heterodimerización entre las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  (Jiang et al., 1996; Wang et al., 1995). La subunidad  $\alpha$  es sobre la que recae la regulación en hipoxia ya que es inestable en condiciones de normoxia y se estabiliza en condiciones de hipoxia mientras que la subunidad  $\beta$  presenta una expresión constitutiva que no se regula por la tensión de oxígeno (Wang et al., 1995). El mecanismo de estabilización de las subunidades HIF $\alpha$  se encuentra regulado por tres enzimas con actividad prolil hidroxilasa denominadas PHD1, PHD2 y PHD3 (del inglés: *prolyl hydroxylase domain-containing proteins*). PHD1, PHD2 y PHD3 pertenecen a la superfamilia de oxigenasas dependientes de ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ) y 2-oxoglutarato (también llamado  $\alpha$ -cetoglutarato), cuya actividad - como cualquier hidroxilasa - es absolutamente dependiente de oxígeno ya que lo usan como cosustrato (Figura 1) (Kaelin & Ratcliffe, 2008). En condiciones de normoxia, las prolil hidroxilasas (PHD-1, -2 y -3) utilizan el oxígeno para hidroxilar residuos de prolina críticos en HIF1 $\alpha$  (P402 y P564) y HIF2 $\alpha$  (P405 y P531) incluidos en la región que abarca de 401 a 603 en HIF1 $\alpha$  y de 405 a 570 en HIF2 $\alpha$  que se denomina ODDD (del inglés: *oxygen-dependent degradation domain*) (Huang et al., 1998; Klinger et al., 2011). Estas prolinas hidroxiladas son reconocidas por el factor von Hippel-Lindau (VHL) perteneciente al complejo multiproteico ubiquitina ligasa E3, que poliubiquitina

las subunidades  $\alpha$  que son posteriormente degradadas por el proteasoma (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Por lo tanto, en condiciones de normoxia las subunidades HIF $\alpha$  son degradadas mediante el sistema PHD-VHL. Por el contrario - en condiciones de hipoxia cuando el suministro de oxígeno está limitado - las PHDs no tienen suficiente oxígeno para hidroxilar los residuos de prolina de las subunidades HIF $\alpha$ , lo que desencadena su estabilización ya que no pueden ser reconocidas por VHL. Por lo tanto, de esta manera, alterando el sistema PHD-VHL en normoxia puede llegarse a inducir el sistema HIF. En este sentido inhibidores farmacológicos de estas PHDs así como la inactivación genética de las PHDs o VHL desencadenan la estabilización de los factores de transcripción HIF $\alpha$  en condiciones de normoxia (Figura 1) (Aragonés et al., 2008, 2009; Fraisl et al., 2009; Jaakkola et al., 2001; Rankin et al., 2005).

Tras su estabilización las subunidades HIF $\alpha$  heterodimerizan con la subunidad HIF $\beta$  donde se unen a regiones promotoras - o reguladoras de la transcripción - de más de 300 genes, que presentan secuencias consenso RCGTG para la unión de los heterodímeros HIF $\alpha/\beta$  denominados elementos de respuesta a hipoxia (HRE) (Figura 1). La regulación de los factores HIF no solo está controlada por la estabilización de las subunidades HIF $\alpha$  sino también por mecanismos que regulan su actividad transcripcional. Este fenómeno está controlado por otra hidroxilasa denominada factor de inhibición de HIF (FIH). FIH es capaz de hidroxilar un residuo de asparagina situado en el dominio de transactivación CTAD (del inglés: *C-terminal transactivation domain*) (en posición 803 para HIF1 $\alpha$  y 847 para HIF2 $\alpha$ ) en presencia de oxígeno (Hewitson et al., 2007; Lando et al., 2002; Mahon et al., 2001), lo que impide la interacción de los coactivadores transcripcionales p300 y CBP. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, FIH no tiene oxígeno suficiente para hidroxilar estos residuos de asparagina lo que facilita la interacción de p300 y CBP a CTAD. Por lo tanto, la regulación de HIF en condiciones de hipoxia tiene lugar tanto por la estabilización de las subunidades  $\alpha$  como por la potenciación de su actividad transcripcional (Figura 1).

Un aspecto relevante que debe comentarse sobre las actividades PHDs y FIH es su sensibilidad al oxígeno que permite que el sistema PHD/FIH/HIF se active en hipoxia moderada (cuando aún hay oxígeno remanente) y sin necesidad de alcanzar situaciones de anoxia.





**Figura 1. Mecanismo de regulación de las subunidades HIF $\alpha$ .** Cuando el oxígeno está disponible (panel izquierdo), las enzimas PHDs pueden acceder a este sustrato para hidroxilar las subunidades HIF $\alpha$  en dos residuos de prolina críticos, que posteriormente serán reconocidos por VHL. Entonces, las subunidades HIF $\alpha$  serán ubiquitinadas por VHL y degradadas por la vía del proteosoma. Sin embargo, cuando el oxígeno se vuelve limitante (panel derecho), las PHDs no tienen suficiente sustrato para realizar su función, por lo que las subunidades HIF $\alpha$  no son hidroxiladas y VHL no puede reconocerlas. Entonces, las subunidades HIF $\alpha$  se acumulan y activan para promover la transcripción génica. Este mismo panel derecho se refiere a las células que son deficientes para VHL (indicado por una cruz roja que tacha VHL), donde las subunidades HIF $\alpha$  se acumulan incluso en condiciones de normoxia (escenarios pseudohipóxicos) ya que, en ausencia de VHL, dichas subunidades no pueden ser ubiquitinadas ni degradadas, a pesar de que la disponibilidad de oxígeno sea la adecuada, y, como consecuencia, las vías dependientes de HIF están activas de manera constitutiva.

En este sentido, la afinidad de las PHDs por el oxígeno es baja cuando se compara con otras actividades enzimáticas ya que las PHDs presentan una  $K_m$  de 100 a 250  $\mu\text{M}$  (Ehrismann et al., 2007; Koivunen et al., 2004). Esto permite que en condiciones de hipoxia moderada el oxígeno “salga” fácilmente de los centros activos de las PHDs y permita la activación del sistema HIF (Gnaiger et al., 1998; Ward, 2008). Por otro lado, FIH tiene mayor afinidad por el oxígeno que las PHDs, con una  $K_m$  en torno a 90  $\mu\text{M}$ , de manera que tiene que haber menor disponibilidad de oxígeno para inhibir a FIH que a las PHDs. Además, la hidroxilación de la asparagina inhibe el dominio CTAD, pero mantiene operativo el dominio de transactivación NTAD (del inglés: *N-terminal transactivation domain*) (Dayan et al., 2006; Koivunen et al., 2004). Por lo tanto, esta regulación permite que el sistema HIF se active ya en condiciones de hipoxia

moderadas o fisiológicas pero que su actividad pueda aún elevarse más, conforme se alcanzan condiciones de hipoxia más severas.

## 1.2. Diferencias funcionales entre las isoformas HIF1 $\alpha$ y HIF2 $\alpha$ .

Los factores HIF controlan numerosos procesos biológicos de respuesta a hipoxia tales como la angiogénesis, la eritropoyesis o la reprogramación metabólica (Kaelin & Ratcliffe, 2008; Semenza, 2012) (Figura 1) pero no todas estas respuestas son igualmente controladas por las isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ . En este sentido debe mencionarse que algunos de los genes controlados por HIF pueden ser regulados igualmente por ambas isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ , como es el caso de *VEGF-A* (del inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor A*) implicado en la **respuesta angiogénica** en respuesta a hipoxia, necesario para restaurar el flujo sanguíneo en los focos hipóxicos. Sin embargo, otros genes y acciones biológicas están preferente o exclusivamente controladas por la isoforma HIF1 $\alpha$  o la isoforma HIF2 $\alpha$ . En este contexto una de las funciones más estudiadas de las proteínas HIFs es la **reprogramación metabólica** que se caracteriza por disminuir la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y por lo tanto el consumo de oxígeno mitocondrial con el fin de ahorrar oxígeno en condiciones de hipoxia y simultáneamente potenciar la glucólisis anaerobia, por lo tanto, independiente de oxígeno (Aragón et al., 2009; Menendez-Montes et al., 2016). La inducción de una buena parte de las enzimas glucolíticas se ha asociado exclusivamente con la isoforma HIF1 $\alpha$ , que estimula el flujo glucolítico mediante la inducción transcripcional de enzimas como hexoquinasa 2 (HK2), aldolasa A (ALDA), Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1), enolasa 1 (ENO1) (Hu et al., 2003; Hu et al., 2007; Iyer et al., 1998; Semenza et al., 1994). De hecho, los genes que codifican enzimas glucolíticas tales como *PGK1*, *PDK1*, *ALDA*, etc., están controlados exclusivamente por HIF1 $\alpha$  en diferentes modelos celulares, lo que indica el papel protagonista de HIF1 $\alpha$  en la potenciación del flujo glucolítico en condiciones de hipoxia (Hu et al., 2003; Hu et al., 2007; Iyer et al., 1998; Menendez-Montes et al., 2016; Semenza et al., 1994). Otra función biológica donde se aprecian las diferencias entre las isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  es en el **control de la proliferación celular** que - por su relación con la hipótesis planteada en esta tesis - se tratará específicamente en el siguiente apartado. Por último, otra respuesta central a la hipoxia es la **potenciación de la eritropoyesis** la cual está controlada fundamentalmente por la isoforma HIF2 $\alpha$  y que de nuevo por su

relevancia en esta tesis le dedicamos más abajo una sección completa en esta introducción.

### 1.3. HIF2 $\alpha$ como activador de la proliferación autónoma de célula.

Como se ha mencionado anteriormente una de las funciones fundamentalmente reguladas por HIF2 $\alpha$  - y no por HIF1 $\alpha$  - es la potenciación de la proliferación autónoma celular. A continuación, detallamos los escenarios biológicos donde HIF2 $\alpha$  se ha implicado en promover estas respuestas pro-proliferativas.

**a) Carcinoma renal de célula clara:** Uno de los escenarios biológicos donde más ampliamente se ha estudiado el papel de las isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en proliferación autónoma de célula es el carcinoma renal de célula clara (ccRCC, del inglés: *clear cell renal cell carcinoma*) que se caracteriza por la pérdida de *VHL* y la consecuente estabilización de HIF en condiciones de normoxia (Gordan et al., 2008; Gordan, et al., 2007). En este sentido, se han descrito funciones antagónicas para las isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en proliferación celular en ccRCC. HIF1 $\alpha$  es capaz de reprimir la proliferación de las células tumorales en diferentes escenarios biológicos (Carmeliet et al., 1998; Gordan et al., 2007; Hubbi et al., 2013; Shen et al., 2011), incluidos ccRCC donde actúa como un supresor tumoral, mientras que HIF2 $\alpha$  favorece la proliferación y la progresión de células de carcinoma renal deficientes en *VHL* (Gordan et al., 2008; Gordan, et al., 2007). En este contexto es importante mencionar la relación de las proteínas HIFs con el factor pro-proliferativo c-Myc, el cual es un proto-oncogén que actúa como factor de transcripción modulando la expresión de genes relacionados con el ciclo celular (Nilsson & Cleveland, 2003). En esta línea, c-Myc se ha identificado como factor de transcripción que promueve el ciclo celular mediante la activación de genes como ciclina D2 (CCND2) y E2F2 así como reprimiendo a los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CDKN1A y CDKN1B o p21 y p27 respectivamente) (Adhikary & Eilers, 2005). HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  manifiestan efectos opuestos en cuanto a su interacción con c-Myc. HIF1 $\alpha$  interrumpe la unión al ADN de c-Myc uniéndose a Sp1 lo que provoca el desplazamiento de c-Myc del complejo con el factor de transcripción Sp1 (Koshiji et al., 2004, 2005; To et al., 2006). Además, se ha observado que HIF1 $\alpha$  se une a MAX bloqueando la interacción c-Myc/MAX que provoca una menor unión de c-Myc al promotor de sus genes diana (Gordan et al., 2007). Sin embargo, HIF2 $\alpha$  estabiliza la unión al ADN de c-Myc aumentando la estabilización del complejo c-Myc/MAX que amplifica el efecto de c-Myc sobre los reguladores del ciclo celular (Gordan et al., 2007). Al margen de las acciones de HIF1 $\alpha$  como represor de c-Myc también se han descrito algunos genes que se han visto inducidos preferentemente

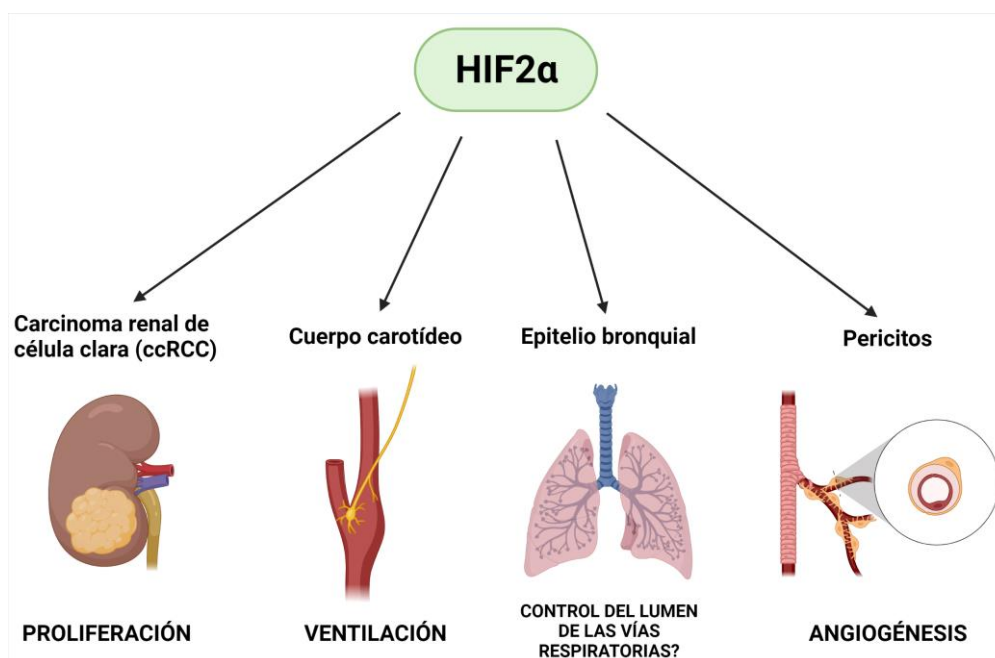
por HIF1 $\alpha$ , en células tumorales renales, deficientes en *VHL*, como la anhidrasa carbónica 9 (*CAIX*) implicada en la regulación del pH asociado al aumento de glucólisis y *BNIP3* (del inglés: *BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3*) implicado en la protección celular mediada por autofagia. Por otro lado, HIF2 $\alpha$  - independientemente de sus acciones sobre c-Myc - induce otros genes que se han implicado en su función pro-proliferativa. HIF2 $\alpha$  induce ciclina D1 (*CCND1*) específicamente en las células ccRCC la cual es clave para la formación de tumores sólidos vía HIF2 $\alpha$  en carcinoma renal (Figura 2) (Raval et al., 2005; Schietke et al., 2012; Zhang et al., 2013). Además HIF2 $\alpha$  induce el factor *TGFA* (del inglés: *Transforming Growth Factor Alpha*) el cual activa el receptor para el factor de proliferación epitelial EGF (EGFR) que permite la proliferación de las células de carcinoma renal (Smith et al., 2005). Además, HIF2 $\alpha$  induce la expresión de *GLUT1* (del inglés: *Glucose Transporter 1*) el cual está implicado en facilitar la entrada de glucosa a las células ccRCC y potenciar así su capacidad protumoral (Chan et al., 2011; Meléndez-Rodríguez et al., 2018). Por último, destacar - y de especial relevancia en esta tesis - la capacidad de HIF2 $\alpha$  para inducir el transportador de aminoácidos LAT1 (del inglés: *L-Type Amino Acid Transporter 1*) o *SLC7A5* (del inglés: *Solute carrier family 7 member 5*) el cual permite la entrada de aminoácidos esenciales como leucina que permite la activación de mTORC1 y el crecimiento de tumores ccRCC (Elorza et al. 2012). Cabe destacar que estas vías parecen ser especialmente relevantes en condiciones *in vivo*, donde la masa tumoral se caracteriza por un menor suministro de oxígeno y nutrientes además de un peor acceso a factores de crecimiento e incluso a condiciones de estrés intratumorales. En este escenario HIF2 $\alpha$  juega un papel central en la supervivencia y progresión de tumores ccRCC favoreciendo simultáneamente la expresión del transportador de glucosa *GLUT1*, el transportador de aminoácidos *SLC7A5* y el factor proangiogénico *VEGFA* que facilitan el suministro de oxígeno y nutrientes al tumor (Shinojima et al., 2007; Zhang et al., 2013). Además, HIF2 $\alpha$  potencia genes antioxidantes implicados en aliviar el estrés oxidativo y de retículo producido en el tumor favoreciendo su supervivencia (Bertout et al., 2009).

**b) Cuerpo carotídeo:** Otros escenarios donde HIF2 $\alpha$  induce proliferación es el cuerpo carotídeo, el cual es un órgano neuroendocrino situado en la bifurcación de la yugular e implicado en la potenciación de la respiración cuando la presión parcial de oxígeno sanguínea disminuye (Macias et al., 2018; Ortega-Sáenz & López-Barneo, 2020). En este sentido la hipoxia induce la proliferación de las células glómicas que expresan tirosina hidroxilasa (TH) en el cuerpo carotídeo vía HIF2 $\alpha$ . Estas células TH positivas

liberan serotonina que activa la inervación aferente que controla la ventilación (Fielding et al., 2018; Hodson et al., 2016; Macias et al., 2018). Por lo tanto, esta respuesta proliferativa aumenta el tamaño del cuerpo carotídeo y permite, por tanto, aumentar el potencial del cuerpo carotídeo para facilitar la ventilación y así contribuir a la respuesta compensatoria a la hipoxia sistémica (Figura 2). Los mecanismos implicados no se conocen en detalle, aunque un trabajo reciente ha implicado a la activación del eje HIF2 $\alpha$ -mTORC1 en este proceso proliferativo (Macias et al., 2018), lo que podría sugerir que el eje de acción HIF2 $\alpha$ -SLC7A5-mTORC1 - identificado inicialmente en carcinoma renal - podría ser operativo también en el cuerpo carotídeo en condiciones de hipoxia.

**c) Epitelio bronquial (células Club y cuerpos neuroepiteliales):** Otra localización anatómica donde se han observado eventos proliferativos en respuesta a hipoxia vía HIF2 $\alpha$  es en el epitelio bronquial (Figura 2). En particular esta respuesta proliferativa se ha encontrado especialmente confinada en las células Club del epitelio bronquial (Torres-Capelli et al., 2016). Además, se ha demostrado que HIF2 $\alpha$  también es capaz de activar mTORC1 en el epitelio bronquial en condiciones hipóxicas. Por lo tanto, de nuevo es posible que el eje HIF2 $\alpha$ -mTORC1 pueda estar conservado en diferentes escenarios proliferativos iniciados por HIF2 $\alpha$  y por lo tanto un eje central para estas respuestas proliferativas (Torres-Capelli et al., 2016). Además, la respuesta proliferativa a la hipoxia en pulmón se ha observado también en los cuerpos neuroepiteliales (NEBs). En este sentido ratones deficientes en *Phd1* y *Phd3* - y por lo tanto con una mayor actividad HIF - cursan con una marcada hiperplasia de los NEBs (Pan et al., 2012; Pan et al., 2016).

**d) Pericitos cerebrales.** Por último, un estudio reciente ha descrito otro evento proliferativo mediado por HIF2 $\alpha$  en pericitos cerebrales (Figura 2). En este sentido la inactivación de las *Phds* en estas células murales promueve su proliferación la cual desaparece cuando HIF2 $\alpha$  se inactiva simultáneamente. Por lo tanto, la activación de HIF2 $\alpha$  es suficiente para promover la proliferación de los pericitos cerebrales (Urrutia et al., 2021) que aumenta la vascularización cerebral encaminada a facilitar la oxigenación cerebral en condiciones de hipoxia.



**Figura 2. Funciones de HIF2 $\alpha$  relacionadas con la proliferación autónoma de célula en diferentes escenarios biológicos.** El esquema representa los escenarios en los que HIF2 $\alpha$  controla la proliferación en (i) células de carcinoma renal, (ii) células de cuerpo carotídeo que permite la potenciación de la ventilación en condiciones de hipoxia, (iii) células del epitelio bronquial asociada a una función biológica aún desconocida y (iv) en pericitos cerebrales asociada a la expansión del lecho capilar neurovascular.

#### 1.4. Diferencias de las regiones N y C-terminales presentes en HIF1 $\alpha$ y HIF2 $\alpha$ .

Una pregunta establecida en el campo de HIF que permanece bastante desconocida es cuál es la base molecular que explica la especificidad de las acciones de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  y por tanto qué regiones de dichas isoformas confieren dicha especificidad. Las proteínas HIFs presentan dos grandes regiones N y C-terminal que a su vez se subdividen en varios dominios funcionales. Estas regiones se distinguen por su cercanía a su extremo N o C-terminal. La región N-terminal comprende el dominio hélice-giro-hélice básico (bHLH) y el dominio PER-ARNT-SIM (PAS) (Hu et al., 2007; O'Rourke et al., 1999) implicadas en la heterodimerización con la subunidad  $\beta$  y la unión a ADN. HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  muestran un alto grado de semejanza de aminoácidos en esta mitad N-terminal donde comparten un 83 y un 70% de identidad de secuencia en sus regiones de unión a ADN y de dimerización, respectivamente (Figura 5A, Resultados). Sin embargo, las regiones C-terminales de estas proteínas presentan una identidad de secuencia de aminoácidos menor que la región N-terminal (Figura 5A, Resultados) (Hu et al., 2007). Esta región comprende el dominio de transactivación N-terminal (NTAD) (incluido en el dominio ODDD donde se encuentran las prolinas



críticas para su estabilización) y el dominio de transactivación C-terminal (CTAD) mencionado anteriormente donde interaccionan FIH y los reguladores p300/CBP. Si debe mencionarse que FIH interacciona fundamentalmente con HIF1 $\alpha$  mientras que la interacción con HIF2 $\alpha$  es más débil (Bracken et al., 2006; Koivunen et al., 2004). Por último, las subunidades HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  presentan cierta homología en la región entre NTAD y CTAD que se denomina el dominio de inhibición (IH) (Hu et al., 2007; O'Rourke et al., 1999). Como se ha mencionado anteriormente los genes que codifican para las enzimas glucolíticas (p.ej. *PGK1*) se regulan únicamente por HIF1 $\alpha$ . Además, reguladores del pH celular (p.ej. *CAIX*) necesarios para contrarrestar el aumento de pH asociado a la potenciación de la glucólisis también se regulan específicamente por HIF1 $\alpha$ . La especificidad de HIF1 $\alpha$  por *PGK1* se atribuye principalmente a su dominio NTAD en las líneas celulares HEK293T y Hep3B (Hu et al., 2007). Sin embargo, ambas regiones bHLH-PAS y NTAD/CTAD parecen ser necesarias para otros genes dependientes de HIF1 $\alpha$  como *CAIX* en la línea celular de carcinoma renal 786-O (Lau et al., 2007; Pawlus et al., 2013). En cuanto a HIF2 $\alpha$  los dominios NTAD/CTAD son los responsables de la inducción específica del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (*PAI1*) y *CITED2* (del inglés: *Cbp/p300-interacting transactivator 2*) en algunas líneas celulares como Hep3B (Hu et al., 2007), como también *PHD3* en la línea celular 786-O (Lau et al., 2007). Además, se ha descrito que las isoformas de HIF presentan distribuciones de unión al ADN diferentes entre ellas. HIF1 $\alpha$  se ha visto mayoritariamente asociado con las modificaciones de histonas H3K4me3 (marca de elementos reguladores relacionados principalmente con promotores y sitios de comienzo de la transcripción) y H3K9ac (marca de elementos reguladores activos preferentemente en promotores), mientras que HIF2 $\alpha$  se asocia especialmente con H3K4me1 (marca conocida por estar asociada a potenciadores y otros elementos reguladores distales) y H3K27ac (marca de promotores y potenciadores activos) (Smythies et al., 2019). Por lo tanto, parece que HIF1 $\alpha$  se une preferentemente a regiones reguladoras de promotores y HIF2 $\alpha$  se une principalmente a regiones de potenciadores más alejadas del inicio de transcripción de los genes que regula. Por lo tanto, las proteínas HIF no solo presentan especificidad por genes concretos sino también por regiones no codificantes diferentes. Asimismo, se han propuesto también factores de transcripción asociados a cada isoforma de HIF añadiendo así una mayor selectividad por los genes diana de cada isoforma. En este sentido el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) puede ser reclutado al promotor de genes diana de HIF1 $\alpha$  como *CAIX* o *PGK1* (Pawlus et al., 2014; Pawlus et al., 2013). Por otro lado, USF2 (del inglés: *upstream stimulatory factor 2*) se ha asociado mayoritariamente a los genes dependientes de HIF2 $\alpha$  como *EPO* y *PAI1*. En esta

línea, se ha observado una interacción física entre USF2 y las regiones NTAD y CTAD de HIF2 $\alpha$  (Pawlus et al., 2012; Pawlus et al., 2013). Los estudios referentes a las regiones de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  implicadas en su especificidad de acción son aún limitados y restringidos a un número particular de genes y por lo tanto este es un aspecto que requiere aún mayor grado de investigación.

## 2. Metabolismo de aminoácidos.

### 2.1. Aminoácidos y mTORC1

La célula es capaz de sintetizar una parte de los aminoácidos existentes denominados aminoácidos no esenciales. Sin embargo, existe otro grupo de aminoácidos para los que la célula no dispone de la maquinaria enzimática para sintetizarlos y que por tanto es necesario importarlos a través de transportadores de membrana específicos para satisfacer el correcto funcionamiento de la célula. Estos aminoácidos esenciales son generados por bacterias, así como células vegetales y por lo tanto las células animales deben captarlos procedentes de la dieta. Ambos tipos de aminoácidos esenciales y no esenciales son obviamente necesarios para la síntesis de proteínas, pero también - como es el caso del aspartato - esenciales para la síntesis de biomoléculas tales como las bases púricas y pirimidínicas necesarias para la síntesis de ADN. Por lo tanto, el aporte óptimo de aminoácidos esenciales juega un papel importante en el control de la proliferación celular no solo para mantener la síntesis de proteínas, sino también para controlar directamente rutas centrales del anabolismo celular. Además, el aporte de aminoácidos induce rutas de señalización centrales en el control de la síntesis de proteínas y la proliferación celular como es el caso de mTOR (del inglés: *mammalian Target of Rapamycin*). mTOR es una serina/treonina quinasa que actúa como regulador central de la síntesis de proteína celular. La activación de mTOR desencadena una cascada de señalización que deriva en la fosforilación de la proteína ribosomal S6 y del efector del complejo de iniciación de la traducción 4EBP que facilita la síntesis proteica. Además, fosforila las proteínas ULK que desencadenan inhibición de la autofagia (Saxton & Sabatini, 2017). mTOR pertenece a la familia de las quinasas relacionadas con la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) e interacciona con numerosas proteínas para formar dos complejos denominados mTORC1 (del inglés: *mTOR complex 1*) y mTORC2. En concreto mTORC1 está compuesto por 6 proteínas diferentes que acompañan a esta subunidad catalítica mTOR las cuales son: Raptor (del inglés: *regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*), esencial



para la actividad catalítica de mTOR (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002), mLST8 (del inglés: *mammalian lethal with sec-13 protein 8*) relacionado con la regulación del complejo mTORC1 mediada por aminoácidos y estabiliza la unión de Raptor a mTOR (Kim et al., 2003), Deptor y PRAS40 (del inglés: *proline rich AKT substrate 40 kDa*) reguladores negativos de mTOR (Peterson et al., 2009; Sancak et al., 2007) y el complejo Tti1/Tel2 importantes para el ensamblaje y mantenimiento del complejo (Kaizuka et al., 2010). El complejo proteico mTORC1 es capaz de integrar múltiples vías de señalización relacionadas con el estatus energético de la célula, el estrés celular, los factores de crecimiento, la tensión de oxígeno y de manera relevante del aporte y concentración intracelular de aminoácidos.

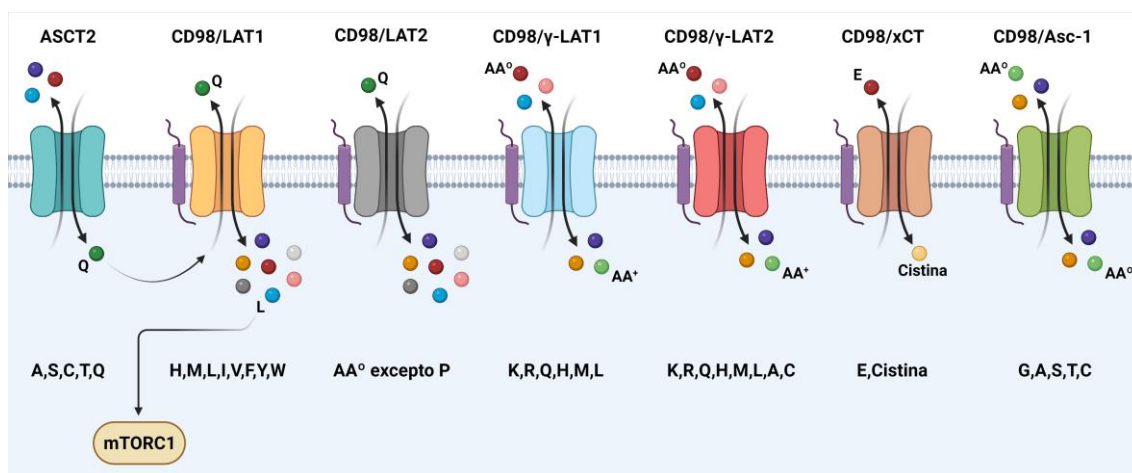
En cuanto a la regulación de mTORC1 mediada por aminoácidos, inicialmente se sugirió que la activación de mTOR dependía principalmente de los niveles de leucina intracelulares (Beugnet et al., 2003; Christie et al., 2002; Hara et al., 1998). Posteriormente, estudios más recientes demuestran que mTOR es sensible también a otros aminoácidos como arginina, glutamina y serina (Carroll et al., 2016; Fan et al., 2016; Jewell et al., 2015; Wang et al., 2015). La regulación de mTORC1 mediada por aminoácidos se lleva a cabo a través de las proteínas Rag GTPasas (del inglés, *ras-related GTP-binding protein*) que se dividen en RagA, B, C y D. RagA o B forma heterodímeros estables con RagC o D lo que permite la generación de 4 posibles dímeros (Sekiguchi et al., 2001). El complejo Rag se encuentra constitutivamente anclado a la membrana de endosomas tardíos o lisosomas a través del complejo MP1-p14-p18 (también llamado del inglés, *Ragulator*) (Sancak et al., 2010) donde se encuentra el activador de mTORC1, Rheb. En ausencia de aminoácidos, RagA o B se encuentran cargados con GDP, mientras que RagC o D contiene GTP, siendo esta conformación incapaz de reclutar a mTORC1 a la superficie del lisosoma. La entrada de aminoácidos produce un cambio conformacional de los dímeros de GDP a GTP en RagA o B y de GTP a GDP en el caso de RagC o D, lo que permite que RagA o B sea capaz de reclutar a mTORC1 a la superficie de los lisosomas (Sancak et al., 2008). Además de las proteínas Rag se ha evidenciado la participación de la v-ATPasa que es necesaria para el anclaje del *Ragulator* a la membrana del lisosoma, a través de un mecanismo de hidrólisis de ATP por la entrada de aminoácidos en el lisosoma (Zoncu et al., 2011). Una vez en el lisosoma, mTORC1 es capaz de activarse tras interactuar con la forma activa de Rheb. Al margen de estos mecanismos ejecutores para la activación de mTORC1 se ha evidenciado que la leucil-ARNt sintetasa (LRS) - que cataliza la reacción de ligación de leucina al ARNt - funciona como un mecanismo sensor inicial de leucina que determina la activación de mTORC1. En este sentido LRS

actúa como una proteína activadora de GTPasa (GAP) que produce el cambio conformacional de los dímeros de Rag (Han et al., 2012) y por lo tanto desencadena la activación de mTORC1.

## 2.2. El transportador de aminoácidos LAT1/CD98 (SLC7A5/SLC3A2).

Para la captación de aminoácidos, la célula, requiere de transportadores específicos en su membrana plasmática. Hasta la fecha se conocen más de 400 genes de transportadores diferentes agrupados en función de su estructura en 60 familias denominadas SLC (del inglés, *solute-linked carrier*) (Schumann et al., 2020), de los cuales 11 son transportadores de aminoácidos que se clasifican en función del sustrato y su dependencia del ión  $\text{Na}^+$  (Bröer & Palacín, 2011; McCracken & Edinger, 2013). Por la relevancia en este estudio nos centraremos inicialmente en el transportador de aminoácidos LAT1 (SLC7A5) el cual es central para la captación de leucina extracelular y la posterior activación de mTORC1 por los mecanismos descritos en el apartado anterior. [Nota previa: A lo largo de este trabajo nos referimos a SLC7A5 y LAT1 indistintamente. SLC7A5 se refiere al gen que codifica LAT1 como proteína]. Este transportador heterodimérico está compuesto por SLC7A5 (LAT1) como cadena ligera (40 kDa) y por SLC3A2 (CD98hc o 4F2hc) como cadena pesada (80-85 kDa). CD98 es una glicoproteína de membrana multifuncional tipo II compuesta por un dominio transmembrana y un gran ectodominio *N*-glicosilado (Devés & Boyd, 2000; Fort et al., 2007), necesaria para la estabilización de la cadena ligera LAT1 en la membrana plasmática. CD98 es capaz de asociarse con otros transportadores de aminoácidos además de LAT1 facilitando así su anclaje a la membrana plasmática. Estos otros transportadores asociados a CD98 son LAT2,  $\gamma$ -LAT1,  $\gamma$ -LAT2, xCT y Asc-1 transportando los aminoácidos que se detallan en la Figura 3 (Bassi et al., 2001; Fotiadis et al., 2013; Fukasawa et al., 2000; Pineda et al., 1999; Sato et al., 1999; Torrents et al., 1998). CD98 se conecta a través de un puente disulfuro a la cadena ligera LAT1, compuesta por 12 dominios transmembrana (Singh & Ecker, 2018) con un elemento estructural característico denominado  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  [ $\text{LeuT}$  (transportador de Leucina) de *Aquifex aeolicus*], que consiste en cinco hélices transmembrana en la mitad N-terminal de la proteína que se repiten con pseudosimetría binaria en la mitad C-terminal (Yamashita et al., 2005). LAT1 transporta aminoácidos grandes neutros que incluyen aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) e histidina, metionina y glutamina (De La Ballina et al., 2016; Kanai et al., 1998). En línea con lo comentado anteriormente de

todos estos aminoácidos la leucina es esencial para explicar la inducción de mTORC1 vía LAT1, pero, dado que se trata de un transporte antiporte, necesita sacar glutamina al exterior para que la leucina pueda ser tomada por la célula. En este sentido Nicklin et al. mostraron que es necesaria la acción conjunta con el transportador de glutamina SLC1A5 (ASCT2) que provee de glutamina intracelular a LAT1 que es intercambiada por leucina extracelular que activa mTORC1 (Figura 3) (Nicklin et al., 2009).



**Figura 3. Transportadores de aminoácidos asociados a CD98 y los aminoácidos que transportan.** Transportadores antiporte asociados a CD98. En el caso de LAT1 se representa su cooperación con ASCT2 que permite la entrada de glutamina (Q) que es exportada por LAT1 para mediar la entrada de aminoácidos de cadena ramificada (L, I, V), aromáticos (F, W, Y) e histidina (H) y metionina (M). La entrada de leucina es necesaria para la activación de mTORC1. AA°, aminoácidos neutros; AA+, aminoácidos polares. A, alanina; C, cisteína; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptófano; Y, tirosina.

### 2.3. Distribución tisular y mecanismos implicados en la inducción de LAT1/CD98.

Durante el desarrollo embrionario se ha localizado la expresión de LAT1 en la médula espinal, así como en el tubo neural en formación en el embrión. Además, los embriones con deficiencia total de *Slc7a5* presentan defectos en estas estructuras neurales (Poncet et al., 2014, 2020). En estadio adulto la expresión basal de LAT1 es especialmente notable en cerebro siendo el tejido donde se expresa de manera más marcada. En particular la expresión de LAT1 está confinada en las membranas apicales y basolaterales de células endoteliales de la barrera hematoencefálica (Kageyama et al., 2000; Tărlungeanu et al., 2016). Esta expresión basal de LAT1 es relevante para el aporte de aminoácidos al tejido cerebral y en este sentido la inactivación de LAT1 específica en endotelio en ratones desencadena un fenotipo

compatible con el autismo así como una actividad motora retardada (Kageyama et al., 2000; Tărlungeanu et al., 2016). En esta misma línea se han identificados pacientes con autismo que presentan mutaciones en homocigosis que disminuyen la actividad de LAT1 (Kageyama et al., 2000; Tărlungeanu et al., 2016). La expresión basal de LAT1 también se ha localizado en placenta, bazo, testículos y colon (Fotiadis et al., 2013; Kanai et al., 1998). En la placenta, LAT1 se distribuye en las superficies maternal y fetal del sincitiotrofoblasto (Ohgaki et al., 2017). Sin embargo, su contribución relativa tanto en placenta como en bazo, testículos y colon es desconocida. Por último, en otros tejidos como hígado, pulmón o riñón, su expresión es más baja llegando a ser casi indetectable, en condiciones basales (Tărlungeanu et al., 2016).

Independientemente de la expresión de *SLC7A5* (LAT1) en algunos tejidos, esta puede incrementar en ciertos escenarios biológicos. Especialmente relevante es el caso del cáncer, donde se ha observado que *SLC7A5* se encuentra sobreexpresado en multitud de líneas celulares tumorales y tumores humanos (Cormerais et al., 2016; Elorza et al., 2012; Fuchs & Bode, 2005; Kaira et al., 2008; K. Kobayashi et al., 2008; Sampedro-Núñez et al., 2020). Efectivamente, la expresión de LAT1/CD98 se asocia a la proliferación celular y sirve como marcador de pronóstico en cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer de mama, próstata y tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos (Furuya et al., 2012; Imai et al., 2010; Kaira et al., 2009; Sakata et al., 2009; Sampedro-Núñez et al., 2020). Se han descrito algunos mecanismos implicados en la sobreexpresión de *SLC7A5* en tumores. *SLC7A5* presenta un sitio de unión canónico de c-Myc que se ha mostrado relevante para controlar su expresión en líneas celulares de cáncer pancreático MIA y Paca-2 (Hayashi et al., 2012). Además, un estudio reciente ha descrito un bucle de retroalimentación positiva en el que *SLC7A5* y c-Myc amplifican su expresión mutuamente en linfoma Burkitt y células de neuroblastoma (Yue et al., 2017). Por otro lado, se ha descrito también que *SLC7A5* puede ser inducido por EZH2, ATF4 o Notch en líneas celulares de cáncer de pulmón, próstata y leucemia linfoblástica aguda, respectivamente (Dann et al., 2015; Grzes et al., 2017; Wang et al., 2011, 2013). Además, se ha localizado un sitio de unión para el receptor de aril hidrocarburos (AHR) en el intrón 2 del gen de *SLC7A5* que promueve su expresión en líneas celulares de cáncer de mama y epitelio bronquial (Le Vee et al., 2016; Tomblin et al., 2016). *SLC7A5* también puede inducirse por los activadores transcripcionales de la vía Hippo, YAP y TAZ en hepatocarcinoma para la activación de mTORC1 (Hansen et al., 2015; Park et al., 2016). Además, la regulación de LAT1 ha sido estudiada en escenarios proinflamatorios. En este sentido, se ha observado que la activación de

linfocitos T por la interleuquina-2 (IL-2) y la migración de fibroblastos vía la interleuquina-17 (IL-17) requiere la inducción de *SLC7A5* en estos tipos celulares (Sinclair et al., 2013; Yu et al., 2018). Recientemente, también se ha evidenciado la contribución de LAT1 en la inflamación asociada a la psoriasis empleando ratones deficientes en *Slc7a5* o tratados con el inhibidor de LAT1 (JPH203), así como en muestras de piel de pacientes con psoriasis. A nivel molecular las citoquinas proinflamatorias IL-23 e IL-1 $\beta$  inducen la expresión de LAT1 que controla la expansión y activación de las células T IL-17+  $\gamma\delta$  y TH17 las cuales son células inflamatorias protagonistas en las lesiones características de las psoriasis (Cibrian et al., 2020). En este contexto, también se ha observado que el marcador de linfocitos T, CD69, se asocia en superficie con LAT1/CD98. Este, a través de la entrada de triptófano, aumenta la activación del receptor de aril hidrocarburos (AhR) contribuyendo al desarrollo de psoriasis mediante la secreción de IL-22 y IL-23 (Cibrian et al., 2016).

Por otro lado, como ya se ha descrito anteriormente, el factor de respuesta a hipoxia HIF2 $\alpha$  es esencial para la inducción de *SLC7A5* en carcinoma renal de célula clara (Betsunoh et al., 2013; Elorza et al., 2012; Higuchi et al., 2019). Esta activación de LAT1 es esencial para entender las funciones de HIF2 $\alpha$  como oncoproteína en carcinoma renal de célula clara (Elorza et al. 2012). Además, este eje de acción HIF2 $\alpha$ -LAT1-mTORC1 se ha confirmado en otros escenarios como líneas celulares de neuroblastoma (Onishi et al., 2019) y cáncer cervical (Corbet et al., 2014). También se ha observado la inducción de LAT1 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama expuestas a hipoxia (Morotti et al., 2019) y en líneas celulares de glioblastoma, siendo en este último caso no mediado exclusivamente por HIF2 $\alpha$  sino también vía HIF1 $\alpha$  (Zhang et al., 2020), lo que sugiere que HIF1 $\alpha$  puede influir en la expresión de *SLC7A5* en ciertos contextos biológicos aunque no parece ser lo habitual. Además, la inducción de *SLC7A5* no solo se ha evidenciado en células tumorales sino en otros escenarios biológicos hipóxicos como en el epitelio pulmonar - posiblemente asociada a la sobreactivación de mTORC1 y proliferación del epitelio bronquial dependiente de HIF2 $\alpha$  mencionada anteriormente - así como en el hígado, aunque en este último caso no asociada a proliferación (Elorza et al. 2012). En esta misma línea, estudios más recientes han evidenciado que HIF2 $\alpha$  puede inducir mTORC1 implicando mecanismos alternativos. HIF2 $\alpha$  reprime la actividad de DEPTOR (del inglés: *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) indirectamente a través de un represor transcripcional dependiente de HIF llamado Dec1 (también llamado BHLHe40, Stra13), lo que permite la activación de mTORC1. En este sentido DEPTOR se encuentra reprimido en células de ccRCC deficientes en *VHL* con actividad constitutiva de los

factores HIF (Doan et al., 2019). Por último, HIF2 $\alpha$ , pero no HIF1 $\alpha$ , induce la expresión del transportador de glutamina *SLC1A5* así como su variante mitocondrial en líneas celulares de cáncer pancreático (Yoo et al., 2019). La absorción de glutamina también juega un papel en la activación mTORC1 a través de la generación de  $\alpha$ -cetoglutarato por glutaminólisis (Durán et al., 2012). El silenciamiento de la variante mitocondrial de *SLC1A5* reprime la biosíntesis de  $\alpha$ -cetoglutarato dependiente de glutamina lo que reduce la actividad de mTORC1 (Yoo et al., 2019). Además, en otros modelos celulares - como se ha mencionado anteriormente - *SLC1A5* contribuye en la activación de mTORC1, facilitando la entrada de glutamina necesaria para mantener la función transportadora de *SLC7A5* (Nicklin et al., 2009). Por lo tanto, HIF2 $\alpha$  puede activar mTORC1 a través de los transportadores de aminoácidos *SLC7A5* y *SLC1A5*, así como reprimiendo DEPTOR vía Dec1. Es posible que todos estos mecanismos actúen coordinadamente para asegurar la respuesta proliferativa dependiente de HIF2 $\alpha$ , no solo en células de carcinoma renal deficientes en *VHL* sino también, en otros contextos biológicos como cuerpo carotídeo, epitelio bronquial u otros escenarios hipóxicos en los que tiene lugar una respuesta proliferativa.

### 3. Eritropoyesis.

#### 3.1. Diferenciación eritroide.

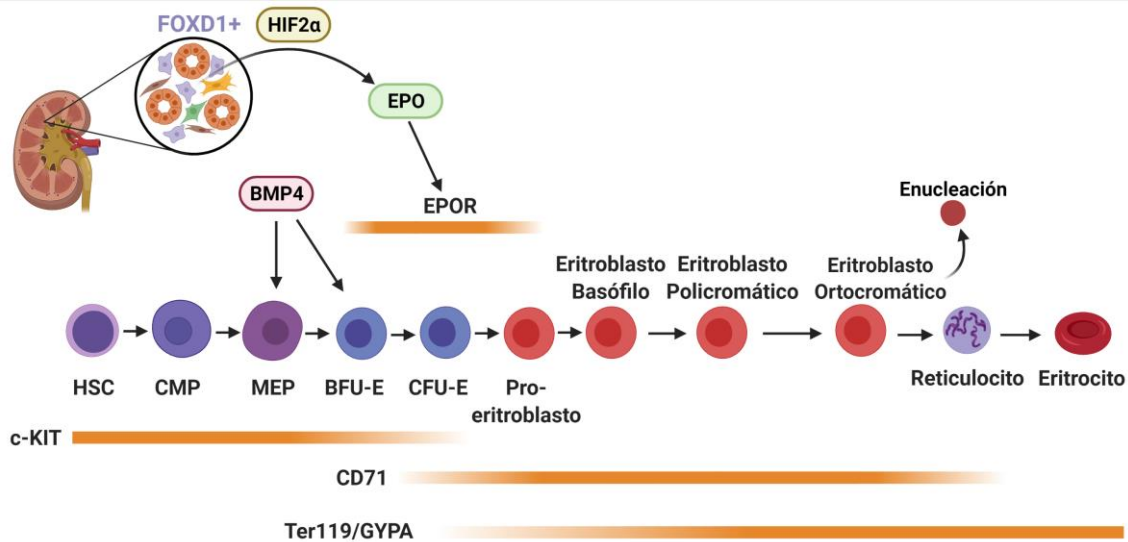
La eritropoyesis es el proceso biológico que permite la generación de glóbulos rojos (eritrocitos) a partir de células madre hematopoyéticas. Este tipo celular presenta una elevada tasa de regeneración, con una producción aproximada de  $2 \times 10^6$  eritrocitos por segundo donde alrededor del mismo número son eliminados y reciclados (Dzierzak & Philipsen, 2013; Higgins, 2015). Durante las tres primeras semanas de gestación la eritropoyesis tiene lugar en el saco vitelino, posteriormente acontece en el hígado y en menor grado el bazo. A partir del séptimo mes, la médula ósea, se convierte en el órgano eritropoyético principal hasta el nacimiento y, posteriormente, en el adulto (Tavian & Péault, 2005). La eritropoyesis es el resultado de un proceso de diferenciación hematopoyético que comienza a partir de células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés: *hematopoietic stem cells*) con capacidad de autorrenovación indefinida (Doulatov et al., 2012; Eaves, 2015). Las células madre hematopoyéticas pueden dar lugar a precursores linfoides o mieloides. Estos a su vez pueden diferenciarse en precursores que tendrán ya un destino concreto que discurre por un escalonado proceso de expansión y maduración (Zivot et al., 2018). Uno de estos precursores mieloides puede diferenciar hacia progenitor megacariocítico-



eritroide (MEP, del inglés: *megakaryocyte–erythroid progenitor*) y este a su vez en el primer progenitor comprometido únicamente hacia la línea eritroide que se denomina BFU-E (del inglés: *burst-forming unit-erythroid*), definido así por su capacidad de formar grandes colonias en medios de cultivo semisólidos (Figura 4) (Gregory & Eaves, 1977; Iscove et al., 1974). A partir de estas células surgen las CFU-E (del inglés: *colony-forming unit-erythroid*), un progenitor más diferenciado que, a diferencia de las BFU-E, se define por formar pequeñas colonias en cultivos semisólidos (Figura 4) (Gregory & Eaves, 1977; Stephenson et al., 1971). Posteriormente los CFU-E se diferencian a proeritroblasto - primer precursor eritroide reconocible morfológicamente - y sucesivamente a eritroblasto basófilo, policromático y ortocromático que progresivamente van perdiendo tamaño celular (Chen et al., 2009). La fase final del desarrollo eritroide culmina con la diferenciación de los eritroblastos ortocromáticos que condensan la cromatina y expelen el núcleo celular convirtiéndose en eritroblastos enucleados que se denominan reticulocitos. Estos reticulocitos aún contienen ARN de su estadio anterior pero progresivamente lo van perdiendo hasta convertirse en eritrocitos maduros que adquieren una forma bicóncava a través de un extenso remodelado de la membrana (Figura 4) (Gifford et al., 2006).

Cada estadio de maduración eritroide se define por la presencia en membrana de marcadores de superficie (algunos de ellos definidos por un CD, del inglés: *cluster of differentiation*) característicos. Estos marcadores varían a lo largo del desarrollo eritropoyético definiendo así poblaciones discretas. Los primeros progenitores eritropoyéticos responden particularmente a la citoquina SCF (del inglés: *stem cell factor*) a través de su receptor c-KIT (CD117) necesarios para la supervivencia de los primeros progenitores hematopoyéticos. c-KIT funciona como marcador de superficie para estos primeros estadios. La expresión del receptor c-KIT se mantiene en células BFU-E y CFU-E donde actúa sinérgicamente con el receptor de EPO (EPOR) (ver también más adelante) para mantener la supervivencia de estas células (Figura 4) (Bunn, 2013; Dzierzak & Philipsen, 2013; Uoshima et al., 1995; Wu et al., 1995). Además, los estadios de BFU-E y CFU-E se han caracterizado por presentar marcadores en superficie tales como CD34+, CD36+, CD45+ y CD71+, (Li et al., 2014). Es especialmente relevante para este estudio el marcador de superficie CD71 que se define como receptor de transferrina 1 (TfR1) necesario para el importe de hierro, por endocitosis, acompañado a su proteína transportadora transferrina (Tr), para evitar así especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas por el hierro libre (Qian et al., 2002). CD71 comienza expresándose en BFU-E donde tiene una expresión moderada y continua de manera más elevada en el resto de los estadios de

diferenciación posteriores desde CFU-E a reticulocito perdiéndose finalmente en los eritrocitos maduros (Figura 4) (Chen et al., 2009). Existe otro marcador de precursores eritroides relevante para este estudio que es la glicoforina de superficie GYPA (CD235a), en humanos, o Ter119 en ratones, el cual no se expresa en los primeros estadios de diferenciación (BFU-E y CFU-E), comienza a expresarse de manera modesta en proeritroblastos y se expresa de manera intensa en el resto de estadios de diferenciación incluido el estadio de eritrocito maduro (Figura 4) (Chen et al., 2009; Hu et al., 2013). Por lo tanto, basado en los marcadores CD71 y Ter119 podemos definir tres grandes grupos de precursores eritroides que serían por orden de diferenciación (1) CD71+/Ter119- que incluye BFU-E, CFU-E y proeritroblastos aunque estos últimos ya empiezan a expresar algo de Ter119, (2) CD71+/Ter119+ que incluye eritroblasto basófilo, policromático, ortocromático y reticulocito y (3) CD71-/Ter119+ que incluye eritrocitos maduros (Figura 4) (Chen et al., 2009).



**Figura 4. Diferenciación del linaje eritroide.** El esquema representa los diferentes estadios de diferenciación del linaje eritroide desde HSC hasta el eritrocito maduro. En la parte inferior se indican los marcadores de superficie más comúnmente usados para identificar los diferentes estadios de diferenciación eritroide. Las células en los estadios de CFU-E y proeritroblasto son las más sensibles y dependientes de la presencia de EPO. La barra nítida indica alta expresión del marcador, la barra difuminada indica una más baja expresión. Las células estromales peritubulares FOXD1+ del riñón son las productoras de EPO renal en respuesta a hipoxia por la acción de HIF2α. Abreviaturas en inglés: HSC, *hematopoietic stem cell*; CMP, *common myeloid progenitor*; MEP, *megakaryocyte-erythroid progenitor*; BFU-E, *burst-forming unit, erythroid*; CFU-E, *colony-forming unit, erythroid*; EPOR, *erythropoietin receptor*.



### 3.2. Regulación de la eritropoyesis por la isoforma HIF2 $\alpha$

En condiciones basales se renuevan cada día alrededor del 1% de los eritrocitos siendo la médula ósea el productor principal de eritrocitos en los mamíferos adultos en condiciones basales. Sin embargo, la tasa de eritropoyesis puede llegar a aumentar en otros órganos como el bazo en respuesta a la falta de aporte de oxígeno (hipoxia) en condiciones de estrés eritropoyético (Paulson et al., 2011; Socolovsky, 2007). La respuesta al estrés eritropoyético comienza con un menor suministro de oxígeno al riñón que activa la producción de EPO exclusivamente mediada por HIF2 $\alpha$  y no por HIF1 $\alpha$ . Por lo tanto escenarios fisiopatológicos como la exposición a la hipoxia en altura, la anemia aguda o la pérdida de sangre (flebotomía), provocan una marcada reducción del oxígeno en circulación que desencadena la estabilización de HIF2 $\alpha$  que aumenta la expresión renal de *EPO*, y por consiguiente la generación de nuevos eritrocitos para restablecer el aporte de oxígeno adecuado a los tejidos (Criswell et al., 2000; Gruber et al., 2007; Hickey et al., 2010). La producción de EPO renal tiene lugar en su mayor parte por las células peritubulares del riñón que se caracterizan por expresar el marcador FOXD1 (Figura 4), y en menor medida por los hepatocitos también exclusivamente por la isoforma HIF2 $\alpha$  (Chavez et al., 2006; Gruber et al., 2007; Haase, 2013; Kapitsinou et al., 2010; Rankin et al., 2007; Warnecke et al., 2004). En este sentido la inactivación de *Epo* o *Hif2 $\alpha$*  empleando líneas de animales FOXD1 cre resultan en una reducción no solo del hematocrito en condiciones de hipoxia o anemia sino incluso en condiciones basales (H. Kobayashi et al., 2016; Rankin et al., 2007; Warnecke et al., 2004). Esta reducción incluso en condiciones basales se debe al hecho de que las células FOXD1 presentan ya un cierto grado de hipoxia basal que mantiene una cierta activación de HIF2 $\alpha$  que regula la producción de EPO y el hematocrito en condiciones fisiológicas basales. Obviamente en condiciones de hipoxia sistémica o anemia, esta hipoxia basal se acentúa promoviendo una mayor inducción de HIF2 $\alpha$  y transcripción del gen de *EPO* en las células FOXD1 positivas y un incremento subsiguiente del hematocrito (Rankin et al., 2007; Warnecke et al., 2004). EPO actúa por medio de receptores de superficie (EPOR) que a su vez activan rutas de señalización vía JAK2 como: STAT5, MAPK y/o PI3K/AKT (Elliott & Sinclair, 2012; Wu et al., 2012). La respuesta a EPO en superficie varía progresivamente durante la diferenciación eritroide siendo - como ya se mencionó anteriormente - parcial en los BFU-E y máxima, en los CFU-E (Bunn, 2013; Dzierzak & Philipsen, 2013). Posteriormente a CFU-E y conforme se va completando la diferenciación eritroide se pierde la capacidad de respuesta a EPO hasta el estadio de proeritroblasto basófilo donde es mínima (Iscove et al., 1974; Sawada et al., 1990; Shih et al., 2018).

Como hemos comentado anteriormente durante el estrés eritropoyético, en modelos murinos, la eritropoyesis vía EPO recae sobre el bazo y el hígado (Ji, 2020; Paulson et al., 2011; Socolovsky, 2007). Precisamente, una de las evidencias más notables del estrés eritropoyético, en modelos murinos, es una marcada esplenomegalia asociada a la expansión de los progenitores eritropoyéticos en el bazo (Hickey et al., 2007; Miró-Murillo et al., 2011; Weitz-Hamburger et al., 1975). En este sentido otro regulador importante en la respuesta al estrés eritropoyético es la proteína BMP4 (del inglés; *Bone Morphogenetic Protein 4*) que actúa de manera coordinada con EPO en el bazo en la expansión de los progenitores BFU-E. Es importante destacar que BMP4 es también un gen dependiente de HIF2 $\alpha$  pero a diferencia de EPO su inducción se ha detectado fundamentalmente en el bazo en condiciones de estrés eritropoyético (Hao et al., 2019; Perry et al., 2007; Wu & Paulson, 2010). Algunos estudios han localizado la expresión de BMP4 en macrófagos esplénicos en línea con evidencias adicionales que demuestran que los macrófagos esplénicos pueden dar soporte a los precursores eritroides para su expansión en condiciones de estrés eritropoyético (Chow et al., 2013; Hao, Xiang, et al., 2019). Por último, en esta misma línea otros estudios han desvelado que HIF2 $\alpha$  se expresa en el endotelio tanto en el bazo como en la médula ósea donde desencadena la inducción de la proteína de adhesión VCAM1 (del inglés: *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) que interacciona con su ligando VLA-4 en eritroblastos participando así en su diferenciación (Fujiwara et al., 2017; Yamashita et al., 2008).

Por último, debe mencionarse que HIF2 $\alpha$  también favorece la captación de hierro necesaria para el incremento de la síntesis de la hemoglobina asociada a la eritropoyesis. En este sentido HIF2 $\alpha$  induce la expresión del transportador de metales divalentes 1 (DMT1, también llamado SLC11A2), que permite la entrada de hierro en los enterocitos. Asimismo, HIF2 $\alpha$  también controla la expresión de la citocromo b reductasa duodenal 1 (dCytB), enzima que reduce el hierro férrico a su forma ferrosa (Fe<sup>2+</sup>) antes de ser adquirido desde la luz del intestino hasta las células intestinales mediante DMT1 (Mastrogiannaki et al., 2009, 2012; Shah et al., 2009). Otras proteínas relacionadas con la eritropoyesis y metabolismo del hierro reguladas por la respuesta a la hipoxia son la transferrina (importante para el transporte de hierro sérico en su forma férrica (Fe<sup>3+</sup>)) y su receptor de alta afinidad TfR1 (también llamado CD71) (Rankin et al., 2007; Tacchini et al., 1999). HIF2 $\alpha$  también controla la enzima hemo-oxigenasa 1 (HO-1) (Lee et al., 1997), necesaria para la degradación de los grupos hemo, y la ferroportina 1 (FPN, también llamado SLC40A1) que permite la salida del

hierro desde el citoplasma de los enterocitos a través de la membrana basolateral (Taylor et al., 2011).

# OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de tesis es evaluar el papel de LAT1 en eritropoyesis y determinar si LAT1 está regulado por HIF2 $\alpha$  de manera autónoma de célula, localizando, además, la región de HIF2 $\alpha$  que le confiere especificidad por SLC7A5 (LAT1).

## PARTE I

1. Determinar el papel de las regiones N-terminal y C-terminal de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en la especificidad de su actividad transcripcional. Comparar la especificidad transcripcional de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en modelos *in vitro* e *in vivo*.

## PARTE II

2. Evaluar la expresión del transportador de aminoácidos LAT1/CD98 en células del linaje eritroide tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones de estrés eritropoyético en anemia, así como explorar el posible papel de HIF2 $\alpha$  en su expresión.
3. Evaluar el papel de LAT1/CD98 en eritropoyesis en condiciones fisiológicas y de estrés eritropoyético empleando animales deficientes en LAT1 específicamente en el linaje eritroide.

# MATERIALES Y MÉTODOS

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Líneas celulares, medios de cultivo y reactivos

Para este estudio se utilizaron las líneas celulares humanas HEK-293T (células embrionarias de riñón) y WT8 derivadas de la línea celular de adenocarcinoma renal humano de célula clara 786-O, en las que se ha restablecido *VHL* de forma estable (vector pRc/CMV-HA-VHL). Estas células WT8 fueron amablemente cedidas por el Dr. William Kaelin (Instituto Dana-Farber, Boston, MA, EEUU). Las dos líneas celulares se mantuvieron en medio DMEM (HyClone, GE HealthCare) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 20 mM de Hepes y 10% de suero fetal bovino (FBS, Cultek). De manera rutinaria, las células se mantuvieron a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire (condiciones de normoxia).

## 2. Construcciones de plásmidos de ADN

Para generar transfectantes estables para la expresión de HIF1α y HIF2α en células WT8, usamos los vectores lentivirales pBabe-puro-HIF1α (P402A/P564A) y pBabe-puro-HA-HIF2α (P405A/P531A) formas estables de HIF1α y HIF2α, carentes de los residuos de prolina susceptibles de hidroxilación por las PHDs y que por tanto no pueden ser degradadas, siendo constitutivamente activas con independencia de la concentración de oxígeno (Yan et al., 2007). Para generar las versiones quiméricas HIFα se insertó un nuevo sitio de restricción XbaI en el aminoácido 411 de HA-HIF1α-P402A/P564A y en el aminoácido 414 de HA-HIF2α-P405A/P531A, donde se introdujo un cambio de nucleótido T>C que permitía generar el sitio XbaI sin modificar el marco de lectura. Para ello, la mitad N-terminal de HA-HIF1α-P402A/P564A (1 a 411) se amplificó usando un oligonucleótido “sentido” donde se introdujo también un sitio de restricción ApaI (sentido, 5'-TTCTCTAaggccc(ApaI)GGCCGGAT-3') y un oligonucleótido “antisentido” en el que se introdujo un sitio de restricción XbaI (antisentido, 5'-TCGTTGCTGCCAAAAtctaga(XbaI)GATATGATTGTGTCTCC-3'). La mitad C-terminal de HA-HIF1α-P402A/P564A (412 a 826) se amplificó usando un oligonucleótido “sentido” donde se introdujo un sitio de restricción XbaI (sentido, 5'-GGAGACACAATCATATCtctaga(XbaI)TTTTGGCAGCAACGA-3') y un oligonucleótido “antisentido” en el que se introdujo un sitio de restricción XbaI (antisentido, 5'-TAACTGACACACATtctaga(XbaI)GGGTCGACCACTGT-3'). La mitad N-terminal de HA-HIF2α-P405A/P531A (1 a 414) se amplificó usando un oligonucleótido “sentido” donde se introdujo un sitio de restricción ApaI (sentido, 5'-TTCTCTAaggccc(ApaI)GGCCGGAT-3') y un oligonucleótido “antisentido” en el que se introdujo un sitio de restricción XbaI (antisentido, 5'-

GTTCTGATTCCCGAAAtctaga(XbaI)GAGATGATGGCG-3'). La mitad C-terminal de o HA-HIF2 $\alpha$ -P405A/P531A (415 a 870) se amplificó usando un oligonucleótido "sentido" donde se introdujo un sitio de restricción XbaI (sentido, 5'-CGCCATCATCTCtctaga(XbaI)TTTCGGGAATCAGAAC-3') y un oligonucleótido "antisentido" en el que se introdujo un sitio de restricción XbaI (antisentido, 5'-TAACTGACACACATtctaga(XbaI)GGGTCGACCACTGT-3'). Los amplicones resultantes de las amplificaciones se clonaron en el vector de clonación pCR™2.1-TOPO™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Tras la confirmación del correcto ensamblaje y sentido de lectura de los amplicones en el vector de clonación por secuenciación, se clonaron sucesivamente las mitades de cada quimera en un vector de expresión lentiviral pLVX-Puro, con resistencia bacteriana a ampicilina y resistencia eucariota a puromicina. Para ello, las regiones N-terminales de HA-HIF1 $\alpha$ -P402A/P564A y HA-HIF2 $\alpha$ -P405A/P531A se cortaron con las enzimas de restricción ApaI y XbaI para clonarlos en el vector de expresión lentiviral pLVX-Puro. Finalmente, la región C-terminal de HA-HIF1 $\alpha$ -P402A/P564A se cortó con la enzima de restricción XbaI para ser clonada en el vector de expresión pLVX-Puro que contenía la región N-terminal de HA-HIF2 $\alpha$ -P405A/P531A. Del mismo modo, la región C-terminal de HA-HIF2 $\alpha$ -P405A/P531A se cortó con la enzima de restricción XbaI para ser clonada en el vector de expresión pLVX-Puro que contenía la región N-terminal de HA-HIF1 $\alpha$ -P402A/P564A.

### 3. Infecciones lentivirales

Para la sobreexpresión en WT8 de las diferentes construcciones de ADN generadas fue necesario transfectar los plásmidos generados y sus correspondientes plásmidos empaquetadores en células HEK-293T. Para ello, se sembraron las células HEK-293T en placas de cultivo p100 y cuando alcanzaron la confluencia deseada se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (11668019, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) en medio OPTI-MEM (11058-021, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) con 3,9  $\mu$ g de pLP1, 2,7  $\mu$ g de pLP2, 3,3  $\mu$ g de VSVg y 9,9  $\mu$ g de cada vector pLVX-Puro con las construcciones o vacío. A las 4 horas de la transfección se cambió el medio OPTI-MEM por medio DMEM fresco. Los sobrenadantes de los cultivos de estas células se recogieron a las 24 horas tras la transfección, se filtraron por filtros con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m y se añadieron a los cultivos de WT8 añadiendo polibreno a una concentración final de 8  $\mu$ g/mL. Las células HEK-293T se reconstituyeron con medio DMEM fresco y se repitió el paso anterior durante los dos días siguientes.



#### 4. Inmunodetección de proteínas por Western Blot

Las células se lisaron en tampón Laemmli (2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 62 mM Tris-HCl pH 6,8 y 0,004% de azul de bromofenol). Las proteínas contenidas en estos lisados se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS al 8% o 10% y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m. Las membranas se bloquearon con TBS-T (50mM Tris HCl, pH7,6, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20) y 5% de leche en polvo desnatada y se incubaron al menos 16 horas a 4°C en cámara húmeda con los anticuerpos primarios correspondientes: HIF2 $\alpha$  (ab199, Abcam, Cambridge, UK); HIF1 $\alpha$  (610959, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, EEUU);  $\beta$ -actina (A3854, Sigma, Saint Louis, MO, EEUU). Tras la incubación, las membranas se lavaron con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los respectivos anticuerpos secundarios. La unión del anticuerpo se detectó mediante quimioluminiscencia potenciada (Clarity, BioRad, Hercules, CA, EEUU; y SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU) y se visualizó en un analizador de imagen luminiscente digital (Image Quant LAS4000 Mini; GE Healthcare, Chicago, IL, EEUU).

#### 5. Extracción de ARN y PCR en tiempo real

La extracción de ARN se realizó siguiendo el método del isotiocianato de guanidina usando TRIsure (BIO-38032, Bioline USA, Inc., Cincinnati, OH, EEUU). El ARN extraído (1  $\mu$ g) fue retrotranscrito usando la enzima Improm-II antisentido transcriptase (Promega, Madison, WI, EEUU). Las amplificaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo usando el kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) en el termociclador QuantStudio5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y los datos de amplificación se analizaron usando el QuantStudio5 Design and Analysis Software v1.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), normalizando los valores de expresión génica a los del ARN ribosómico 28S. Los oligonucleótidos usados en este estudio se incluyen en la siguiente Tabla 1.

HUMANO		
28S	Sentido	5'-GGTAGCCAAATGCCTCGTCAT-3'
	Antisentido	5'-GGATAGTAGGTAGGGACAGTGGGAAT-3'
BNIP3	Sentido	5'-TCAAGTCGGCCGGAAAATAT-3'
	Antisentido	5'-GCGCTTCGGGTGTTTAAAGA-3'
CAIX	Sentido	5'-GGGCCCGGAAGAAAACAGT-3'
	Antisentido	5'-GACCTGAGTCTCTGAGCCTTCCT-3'
PGM1	Sentido	5'-AGCATTCCGTATTTCCAGCAG-3'
	Antisentido	5'-GCCAGTTGGGTCTCATACAAA-3'
PHD3	Sentido	5'-GCCGGCTGGGCAAATACTA-3'
	Antisentido	5'-CCGGATAGCAAGCCACCAT-3'
SLC7A5	Sentido	5'-GGAACATTGTGCTGGCATTATACA-3'
	Antisentido	5'-CCTCTGTGACGAAATTCAAGTAATTC-3'
CCND1	Sentido	5'-CTGTGCATCTACACCGACAACCTC-3'
	Antisentido	5'-AGGTTCCACTTGAGCTTGTTCAC-3'
GLUT1	Sentido	5'-TCAACCGCAACGAGGAGAA-3'
	Antisentido	5'-CTGTCCCGCGCAGCTT-3'
TGFA	Sentido	5'-CACTCAGTTCTGCTTCCATGGA-3'
	Antisentido	5'-CGTACCCAGAATGGCAG-3'
OCT-4	Sentido	5'-GCTTAGCTTCAAGACATGTGTA-3'
	Antisentido	5'-CTCTCACTCGGTTCTCGAT-3'
NDRG1	Sentido	5'-CGGCAACCTGCACCTGTT-3'
	Antisentido	5'-TGTGGTTCCCGGCATT-3'
RATÓN		
Vhl	Sentido	5'-ATCCCTGAAGAGCCAAAGATGA-3'
	Antisentido	5'-GCTGGAGGAGATGCCTTTACTC-3'
Hif1a	Sentido	5'-CACCGATTGCGCCATGGA-3'
	Antisentido	5'-TCGACGTTCAAGAACTCATCTTTTT-3'
Hif2a	Sentido	5'-CCTGGCCATCAGCTTCCTT-3'
	Antisentido	5'-GGTCGGCCTCAGCTTCAG-3'
Phd3	Sentido	5'-TGGACAACCCCAATGGTGAT-3'
	Antisentido	5'-GCAGGACCCCTCCATGTAAC-3'
NdrG1	Sentido	5'-TGGAGTCCTTACCAGTTTGG-3'
	Antisentido	5'-CGAAGCGGGTCAGGATGTAG-3'
Slc7a5	Sentido	5'-TTCGCCACCTACTTGCTCAA-3'
	Antisentido	5'-CCTTTACGCTGTAGCAGTTC-3'
Glut1	Sentido	5'-TCGTCGTTGGCATCCTTATTG-3'
	Antisentido	5'-GAGCAGCAGAGGCCACAAGT-3'
Pgm1	Sentido	5'-CGAGAAGGACGTTGCCAAGA-3'
	Antisentido	5'-GGGACACTTTCAGAGCAATGG-3'
Tgfa	Sentido	5'-GGCTCTGGAGAACAGCACATC-3'
	Antisentido	5'-GGAATCTGGGCACTTGTGAA-3'
Epo	Sentido	5'-CAAAGTCAACTTCTATGCTTGGAAAA-3'
	Antisentido	5'-CAGGCCTTGCCAAACTTCTATG-3'
CalX	Sentido	5'-GCGCTAAGCAGCTCCATACTC-3'
	Antisentido	5'-CGTGGCTCGGAAGTTCAGTT-3'

Tabla 1. Oligonucleótidos sentido y antisentido del ADNc de cada gen analizado en este estudio por PCR a tiempo real (RT-PCR) tanto en humano como en ratón.

## 6. Modelos animales

### Sistemas cre-LoxP

Para este estudio se han utilizado dos modelos animales diferentes clasificados en base a la localización y activación de la recombinasa cre. Por un lado, usamos el sistema *UBC-cre-ER<sup>T2</sup>*, que se caracteriza por expresar de forma ubicua la recombinasa cre y por ser un sistema inducible por tamoxifeno, que permite la

traslocación de la recombinasa cre al núcleo (Ruzankina et al., 2007). Por otro lado, hemos empleado el sistema *ErGFPcre* que expresa la proteína de fusión GFPcre localizada en el promotor endógeno del receptor de eritropoyetina (EpoR) lo que permite la localización y manipulación genómica de las células progenitoras eritroides (Heinrich et al., 2004).

Los ratones *UBC-cre-ERT<sup>2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup>* se generaron cruzando los ratones C;129SVh<sup>tm1Jae</sup>/J (stock no. 4081, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, EEUU), que contienen dos sitios LoxP flanqueando el promotor y el exón 1 del locus murino de *Vhl* (Haase et al., 2001), con los ratones B6.Cg-Ndor1<sup>Tg(UBC-cre/ERT2)1Ejb</sup>/1J (*UBC-cre/ERT<sup>2</sup>*) (stock no. 008085, Jackson Laboratories), que expresan de forma ubicua la recombinasa cre (*cre-ERT<sup>2</sup>*) (Ruzankina et al., 2007). Después los ratones *UBC-cre-ERT<sup>2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup>Hif1 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* se generaron usando los ratones B6.129-Hif1 $\alpha$ <sup>tm3Rsjo</sup>/J (stock no. 007561, Jackson Laboratories) que contienen dos sitios LoxP flanqueando el exón 2 del locus murino de *Hif1 $\alpha$*  (Ryan et al., 1998). Estos ratones se cruzaron con los ratones B6.Cg-Ndor1<sup>Tg(UBC-cre/ERT2)1Ejb</sup>/1J, como se describe anteriormente, para generar los ratones *UBC-cre-ERT<sup>2</sup> Hif1 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>*, que se cruzaron más tarde con los ratones C;129S-Vh<sup>tm1Jae</sup>/J para generar ratones *UBC-cre-ERT<sup>2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup>Hif1 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* y sus correspondientes controles. Los ratones *UBC-cre-ERT<sup>2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup>Hif2 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* se generaron a través de los cruces apropiados usando los ratones *Epas1<sup>tm1Mcs</sup>*/J (stock no. 008407, Jackson Laboratories) que contienen dos sitios LoxP flanqueando el exón 2 del locus murino de *Hif2 $\alpha$*  (Gruber et al., 2007).

Para la inactivación génica, se administró a los ratones *UBC-cre-ERT<sup>2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup>*, *UBC-cre-ERT<sup>2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup>Hif2 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* y *UBC-cre-ERT<sup>2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup>Hif1 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* una inyección al día durante 5 días de 2 mg de tamoxifeno diluido en aceite de girasol (C8267, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 10% etanol (20 mg/mL). Tras los 5 días de tratamiento se esperaban 2-4 días más para su completa inactivación génica antes de la eutanasia.

Los ratones *ErGFPcre Hif2 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* se generaron cruzando los ratones *ErGFPcre B6.C-Epor<sup>tm1.1(EGFP/cre)Uk</sup>/MdfJ* (Stock No: 035702, Jackson Laboratories) que contienen el ADNc que codifica GFPcre en el exón 1 del locus genómico de *EpoR* (Heinrich et al., 2004), con los ratones *UBC-cre-ERT<sup>2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup>Hif2 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* generados previamente en el laboratorio, seleccionando ratones que presentasen únicamente el genotipo *ErGFPcre Hif2 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>*. Los oligonucleótidos empleados para determinar la delección del ADN genómico de *Hif2 $\alpha$*  en el linaje eritroide son: (sentido (1), 5'-CCGTGGGCCCTGTTTTCTTATC-3'; antisentido (2), 5'-

CCTCTTCCTGGTGAGGCCTAA-3'). Los oligonucleótidos empleados para determinar la expresión de ARNm de *Hif2α* en el linaje eritroide son: (sentido (3), 5'-GCGAGCACTAAAGACCTTTTACA-3'; antisentido (4), 5'-GGTCACCACAGCAATGAAACC-3').

Los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* se generaron cruzando los ratones *ErGFPcre B6.C-Epor<sup>tm1.1(EGFP/cre)Uk</sup>/MdfJ* (Stock No: 035702, Jackson Laboratories) con los ratones *B6.129P2-Slc7a5<sup>tm1.1Daca</sup>/J* (Stock No: 027252, Jackson Laboratories), que contienen dos sitios LoxP flanqueando el exón 1 del locus murino de *Slc7a5* (Poncet et al., 2014). Los oligonucleótidos empleados para determinar la delección del ADN genómico de *Slc7a5* en el linaje eritroide son: (sentido (1), 5'-GGCTCCTGGACTTATCTTGACCAATG-3'; antisentido (2), 5'-GTGGTGCTTTGCTGAAGGCAGGG-3') (Poncet et al., 2014).

El genotipaje de los ratones se llevó a cabo a partir de una biopsia de oreja, que fue incubada durante 16 horas a 56°C con 600µl de tampón de lisis (100mM Tris/HCl pH8, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl) y proteinasa K a una concentración final de 100µg/ml. Tras eliminar por centrifugación los restos celulares, se precipitó el ADN del sobrenadante obtenido por adición de isopropanol en volumen 1:1. Este ADN genómico se caracterizó mediante PCR.

#### *Modelo de Fenilhidrazina (PHZ)*

Para generar un modelo de anemia hemolítica en los ratones se inyectó, vía intraperitoneal, 60 µg/g de Clorhidrato de fenilhidrazina (PHZ hydrochloride, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en PBS (pH 7,2), 2 veces con un intervalo de 24 horas o bien 40 µg/g de PHZ en PBS (pH 7,2) una única vez.

#### *Modelo de Flebotomía*

El modelo de flebotomía consiste en una punción en la vena submaxilar para la extracción de alrededor de 200 µl de sangre. Se repite el proceso 3 veces con un intervalo de 24 horas por cada punción.

Para analizar el efecto de la fenilhidrazina o flebotomía en los ratones tratados se tomó muestra de sangre para análisis de hematocrito, análisis de precursores eritroides por citometría de flujo y suero para análisis de EPO circulante por ELISA, antes de la primera inyección/punción y 72 horas después de la primera inyección/punción.

Además, 72 horas post inyección se extrajo el bazo, riñón e hígado de los ratones tras la eutanasia por dislocación cervical. Los bazos se dividieron en 3 fragmentos que se

usaron para análisis de ARN, y citometría de flujo. Los riñones e hígados se usaron íntegramente para el análisis de ARN.

Los ratones fueron criados en el área específica libre de patógenos en el animalario de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación de la UAM (CEIC 55-1002-A049, fecha de aprobación 9 de mayo 2014 y CEIC 103-1993 -341 fecha de aprobación 25 de noviembre 2019) y se llevaron a cabo bajo la supervisión del responsable del animalario de la UAM de acuerdo con la normativa española (RD 53/2013, BOE, 01 de febrero 2013) y europea (EU Directive 2010/63/EU).

## 7. Análisis hematológicos

La sangre se recogió en tubos de extracción veterinaria de silicona con capilar, tratados con EDTA K3 (Sarstedt, Inc., Nümbrecht, Alemania). Los valores de hematocrito (%), concentración de hemoglobina (g/dL), número total de células rojas ( $\times 10^6$  células/ $\mu\text{l}$ ), volumen corpuscular medio (MCV,  $\mu\text{m}^3$ ) y hemoglobina corpuscular media (MCH, pg) de la sangre periférica de los ratones analizados se determinaron usando el analizador hematológico ABX Pentra 80 (Horiba Medical, Madrid, España). Además, se realizó en paralelo un conteo del número total de células rojas ( $\times 10^6$  células/ $\mu\text{l}$ ) usando el contador de células (EVE™ PLUS Automated cell counter, Nanoentek, Guro-gu, Corea del Sur) y una segunda medición de hematocrito (%) mediante centrifugación en capilar.

## 8. Citometría de flujo

Los fragmentos de bazo utilizados para citometría de flujo fueron macerados en filtros de células Falcon de 70  $\mu\text{m}$  (431751, Corning Inc., Nueva York, NY, EEUU). El macerado resultante fue centrifugado 5 minutos a 4°C a 1700 rpm y resuspendido en 1-3 ml de PBS (1% FBS suero fetal bovino, 1% EDTA 5M) en función del tamaño del pellet. Del total de células resuspendidas se bloquearon 100  $\mu\text{L}$  por punto con el anticuerpo monoclonal de ratón frente a los receptores CD16 y CD32 (70-0161-U500, Fc Shield, 1:100) a 4°C durante 20 minutos. Tras un lavado mediante centrifugación las células se incubaron a 4°C durante 30 minutos con los anticuerpos primarios correspondientes en conjunto o por separado: Hoechst 342 (H33342 B2261, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EEUU); CD71 conjugado con PE (553267, BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, EEUU); Ter119 biotinilado (30-5921-U500, Tonbo Biosciences,

San Diego, CA, EEUU); CD98 (4F2) conjugado con APC o con PE/Cy7 (128211, 128213, BioLegend, San Diego, CA, EEUU); IgG APC (400526, BioLegend, San Diego, CA, EEUU); DRAQ5 (62251, Thermo Fisher, Waltham, MA, EEUU). Tras la incubación se retiró el exceso de anticuerpo primario mediante centrifugación y se incubaron las células a 4°C durante 20 minutos con estreptavidina Alexa Fluor 488 (S32354, Invitrogen, Waltham, MA, EEUU) para la detección del anticuerpo biotinilado. La unión del anticuerpo se detectó mediante citometría de flujo (Flowcytometer FACSCanto II analyzer, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EEUU) y los datos resultantes se analizaron usando los softwares BD FACSDiva™ software y BD FlowJo™ v10.7 software.

La inmunodetección por citometría de flujo de las células sanguíneas circulantes comenzó por la dilución 1/40 de la sangre en PBS (1% FBS suero fetal bovino, 1% EDTA 5M) y el bloqueo de 100 µL por punto con el anticuerpo monoclonal de ratón frente a los receptores CD16 y CD32 (70-0161-U500, Fc Shield, 1:100) a 4°C durante 20 minutos. A partir de aquí el protocolo procede igual que para el marcaje del tejido.

## 9. Inmunodetección de EPO por ELISA

Los sueros se obtuvieron mediante centrifugación de sangre durante 20 minutos a 4°C a 10000g. La EPO circulante se analizó en las muestras de suero con el kit Quantikine ELISA Mouse Erythropoietin Immunoassay (MEP00B, R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU). Las muestras de suero se diluyeron 1/3 en el caso de las muestras en condiciones basales y 1/15 en las muestras tratadas en el diluyente calibrador RD6Z. A continuación, se diluyeron 1:1 las diluciones con el diluyente de ensayo RD1W en los pocillos precubiertos con anticuerpo monoclonal de EPO y se incubaron durante toda la noche. A partir de aquí el protocolo procede según las indicaciones del fabricante. La densidad óptica se midió con el espectrofotómetro Spectra MR (29010, Dynex Technologies, Chantilly, VA, EEUU).

## 10. Análisis estadístico

Los detalles estadísticos de los experimentos, como el valor de las medidas de dispersión y precisión (media  $\pm$  SEM) y la significancia estadística, se describe en las figuras y pies de figuras. Las diferencias entre grupos se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de la prueba Tukey *post hoc* o usando t de student seguido de corrección de Welch. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el software

GraphPad Prism (San Diego, CA, EEUU). Los valores p menores de 0,05 se consideraron significativos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

# RESULTADOS

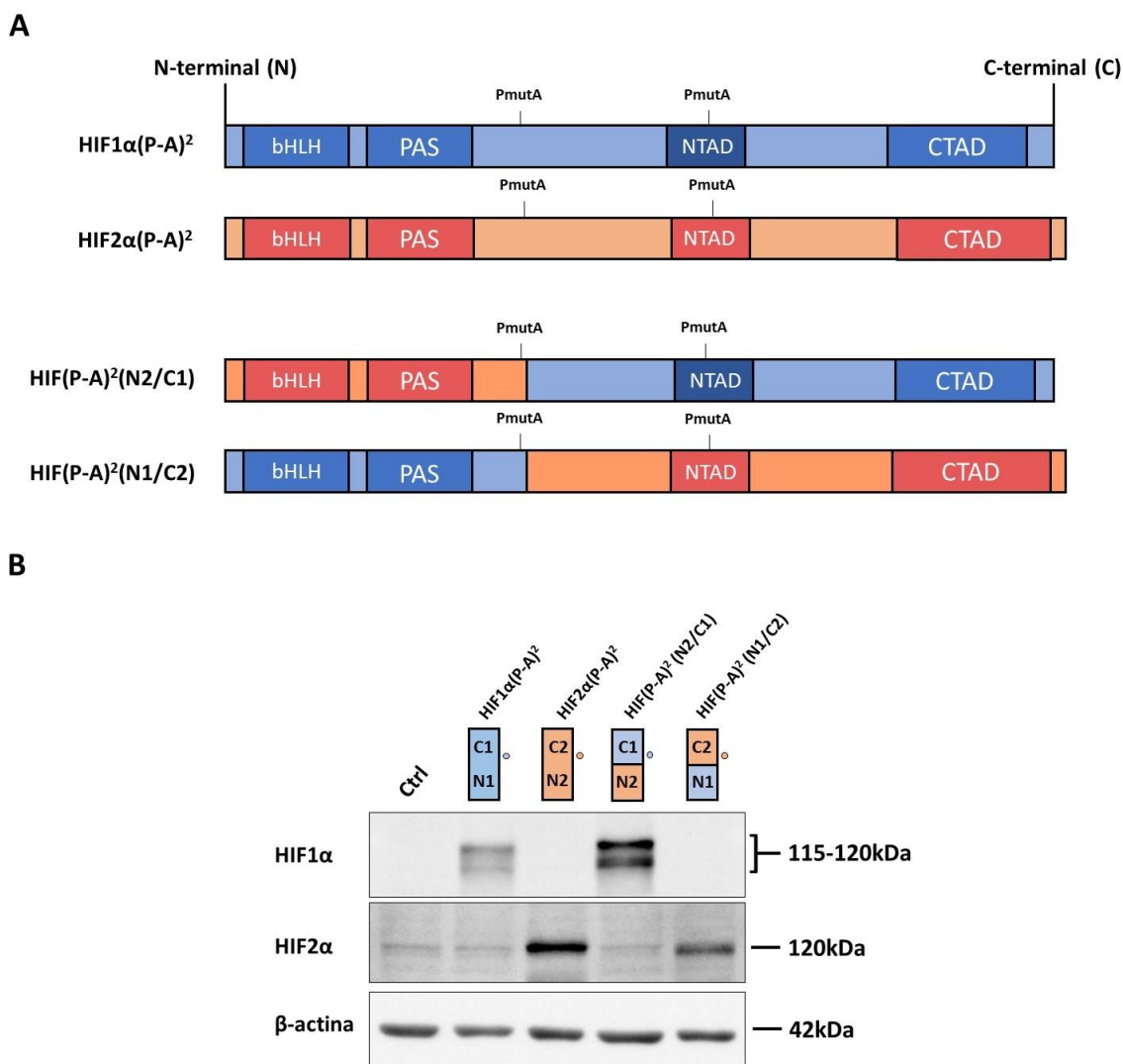


## PARTE I

### 1. Papel de las regiones N-terminal y C-terminal de HIF1 $\alpha$ y HIF2 $\alpha$ en la especificidad de su actividad transcripcional.

Como ya hemos comentado en la introducción, las proteínas HIF están implicadas en numerosas respuestas celulares a la hipoxia como angiogénesis, eritropoyesis o reprogramación metabólica. Algunos genes dependientes de HIF pueden inducirse tanto por HIF1 $\alpha$  como por HIF2 $\alpha$  mientras que otros genes dependientes de HIF presentan cierta preferencia por HIF1 $\alpha$  o HIF2 $\alpha$  en ciertos escenarios biológicos. Uno de estos escenarios donde más se ha estudiado este aspecto es el carcinoma renal de célula clara (ccRCC) deficientes en *VHL*. Las líneas celulares de ccRCC han representado un modelo idóneo para el estudio de la actividad específica de las isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  debido a que se encuentran constitutivamente activas en condiciones de normoxia al carecer de *VHL*. Para estudiar las diferencias en la actividad transcripcional de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en células ccRCC usamos la línea celular WT8, generadas a partir de la restauración de *VHL* en la línea celular 786-O deficiente en *VHL* (Kondo et al., 2002). La especificidad transcripcional de cada isoforma de HIF puede ser estudiada en este modelo celular expresando de manera ectópica las construcciones de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ , constitutivamente activas HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> y HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>. Estas construcciones HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> y HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> son estables ya en normoxia como pudimos confirmar por western blot (Figura 5B) ya que las prolinas necesarias para el reconocimiento por VHL están mutadas a alanina (Figura 5A).

Con este sistema experimental analizamos la expresión de diversos genes dependientes de HIF implicados en diversas funciones ejecutadas en respuesta a hipoxia. En primer lugar, observamos una elevada inducción de *CAIX* (implicada en el control de pH a consecuencia del aumento de glucólisis ejecutado por HIF1 $\alpha$ ), *BNIP3* (implicado en control de autofagia) y *PGM1* (del inglés: *Phosphoglucomutase-1*, implicada en la síntesis de glucógeno en respuesta a hipoxia) exclusivamente con la construcción HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> pero no con la HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, comparado con las células control (Figura 6A). Estos datos están en línea con estudios previos que muestran la inducción de *CAIX*, *BNIP3* y *PGM1* ejecutada fundamentalmente por HIF1 $\alpha$  en células de ccRCC (Lau et al., 2007; Meléndez-Rodríguez et al., 2019; Pelletier et al., 2012; Raval et al., 2005). Por el contrario, la expresión de otros genes dependientes de HIF como *PHD3* (implicada en la regulación de HIF), *CCND1* (implicada en regulación del ciclo celular), *GLUT1* (transportador de glucosa), *TGFA* (inductor de la proliferación en



**Figura 5. Expresión de las construcciones de HIF constitutivamente estables HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> así como de sus versiones quiméricas HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) y HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) en células WT8. (A) Esquema de HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> (en azul) y HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> (en rojo) así como de las construcciones quiméricas HIF1 $\alpha$ /HIF2 $\alpha$  (HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) y HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2)). La construcción HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) contiene los aminoácidos 1-414 de HIF2 $\alpha$ , que incluye su dominio basic hélix-loop-helix-Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS), y los aminoácidos 412-826 de HIF1 $\alpha$ , que incluye sus dominios N-terminal de transactivación y C-terminal de transactivación (NTAD/CTAD). La construcción HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) contiene los aminoácidos 1-411 de HIF1 $\alpha$ , que incluye su dominio bHLH-PAS, y los aminoácidos 415-870 de HIF2 $\alpha$  que incluye sus dominios de transactivación NTAD/CTAD. (B) Análisis representativo por Western blot para determinar la expresión de las proteínas HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> o las construcciones quiméricas HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) o HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) así como  $\beta$ -actina en células control y células que expresan HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> o las construcciones quiméricas HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) o HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2). El círculo indica la posición de reconocimiento del anticuerpo que se utilizó frente a HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ .**

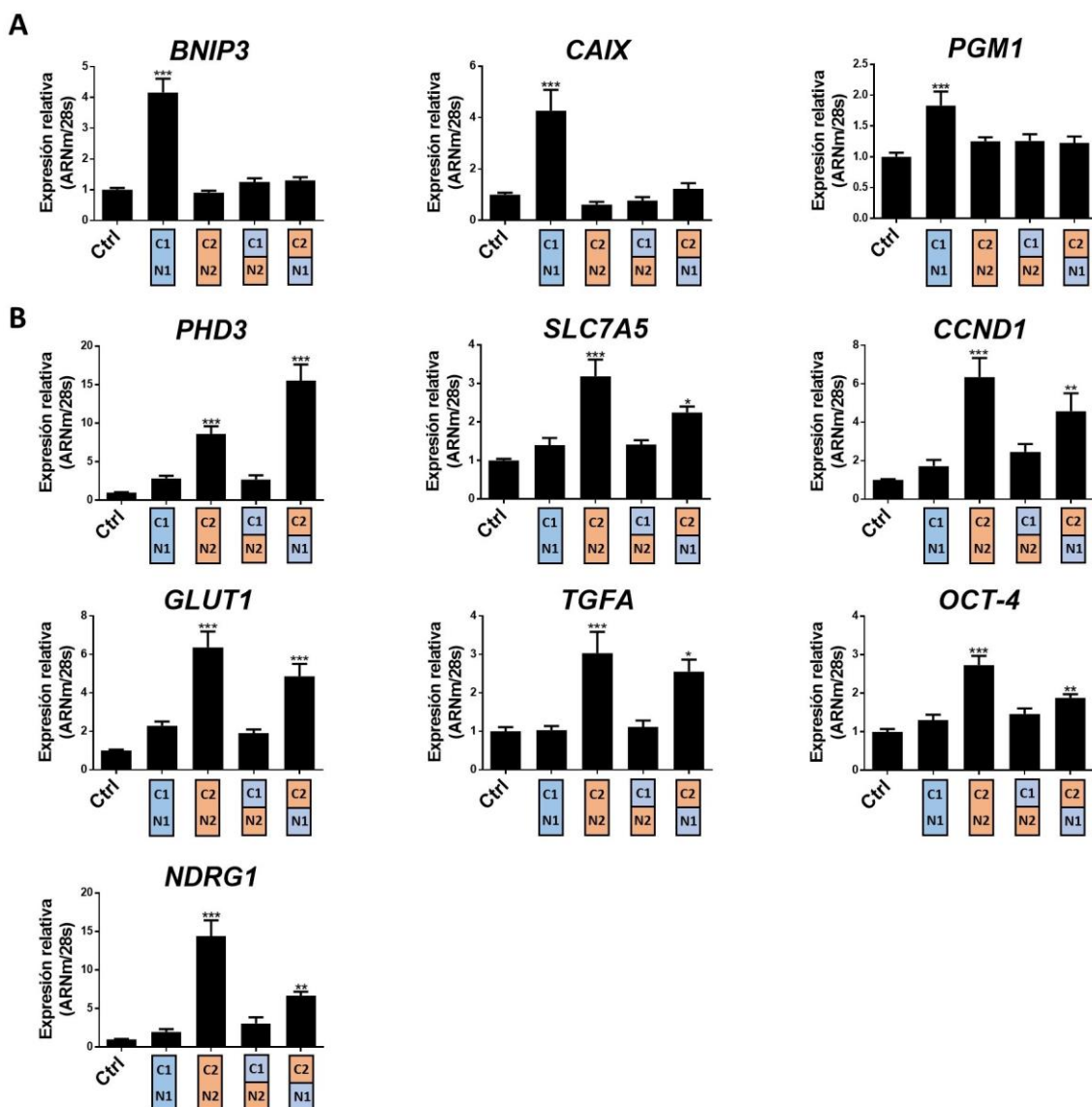
ccRCC), *POU5F1* u *OCT-4* (del inglés: *octamer-binding transcription factor 4*, implicado en mantener a las células madre en un estadio indiferenciado) y *NDRG1* (del

inglés: *N-myc downstream regulated gene 1*, implicado en regulación de la proliferación) están preferentemente elevados por la construcción HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> (Figura 6B), de nuevo en línea con estudios previos que muestran la participación de HIF2 $\alpha$  en la expresión de estos genes (Chen et al., 2016; Covello et al., 2006; Lau et al., 2007; Raval et al., 2005; Smith et al., 2005). Las isoformas de HIF $\alpha$  presentan un mayor grado de semejanza en la secuencia de aminoácidos de la mitad N-terminal implicada en la unión al ADN y la heterodimerización, que en la mitad C-terminal que contiene los dominios de transactivación NTAD y CTAD (Figura 5A). Por lo tanto, quisimos evaluar la contribución relativa de la región bHLH-PAS frente a la región de transactivación NTAD/CTAD de las isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en la especificidad que presentan frente a sus genes diana. Para ello, generamos formas quiméricas de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  con mitades de cada proteína a partir de las construcciones que contienen las prolinas mutadas, previamente descritas. La quimera HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) contiene la región N-terminal bHLH-PAS de HIF1 $\alpha$  (residuos 1 a 411 de HIF1 $\alpha$ ) fusionada a la región C-terminal de estabilización y transactivación de HIF2 $\alpha$  (residuos 415 a 870 de HIF2 $\alpha$ ) (Figura 5A). Asimismo, también generamos la quimera HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) compuesta por la región N-terminal bHLH-PAS de HIF2 $\alpha$  (residuos 1 a 414 de HIF2 $\alpha$ ) fusionada a la región C-terminal de estabilización y transactivación de HIF1 $\alpha$  (residuos 412 a 826 de HIF1 $\alpha$ ) (Figura 5A). Al igual que las construcciones originales, estas quimeras también se expresaron eficientemente en condiciones de normoxia en las células WT8 (Figura 5B). En lo referente a los genes más dependientes de HIF1 $\alpha$  (*CAIX*, *BNIP3* y *PGM1*) no se observa un aumento de sus niveles de expresión ni con la construcción quimérica HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) ni con la HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) (Figura 6A). Por lo tanto, estos datos sugieren que la inducción de los genes *CAIX*, *BNIP3* y *PGM1* dependiente de HIF1 $\alpha$  requieren las dos regiones, bHLH-PAS y de transactivación NTAD/CTAD, para conferir la especificidad transcripcional de HIF1 $\alpha$  (Figura 6A).

Por lo que respecta a los genes dependientes de HIF2 $\alpha$ , inicialmente encontramos que la quimera HIF (P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) solo con el dominio de transactivación de HIF1 $\alpha$  no era capaz de inducir o producía una modesta inducción de los genes dependientes de HIF2 $\alpha$  analizados. Sin embargo, la quimera que contiene solo el dominio de transactivación de HIF2 $\alpha$ , HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) tenía más potencia para inducir genes dependientes de HIF2 $\alpha$ . En este sentido la quimera HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) inducía la expresión de *PHD3* incluso en mayor grado que la versión control HIF2(P-A)<sup>2</sup> (Figura 6B). Además, HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) también induce de manera clara la expresión de *CCND1*, *GLUT1*, *TGFA*, *NDRG1* y *OCT-4*, aunque solo parcialmente comparado con la forma control de HIF2 $\alpha$  (HIF2(P-A)<sup>2</sup>) especialmente *OCT-4* y *NDRG1* donde el

efecto es menos marcado (Figura 6B). Es importante destacar que la proteína quimérica de HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) tenía habitualmente una menor expresión que HIF2(P-A)<sup>2</sup> (Figura 5B), lo que quizás pueda explicar la inducción parcial en la expresión de los genes *CCND1*, *GLUT1*, *TGFA*, *NDRG1* y *OCT-4* por la quimera HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2). Por su especial relevancia en esta tesis doctoral también analizamos la expresión del transportador de aminoácidos *SLC7A5* (LAT1) - que como ya se ha mencionado en la introducción - es un gen específicamente controlado por HIF2 $\alpha$  en carcinoma renal e implicado en las funciones de HIF2 $\alpha$  como oncoproteína en este tipo de tumores. De manera similar al resto de genes dependientes de HIF2 $\alpha$ , encontramos que la quimera HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) tenía un efecto modesto en la expresión de *SLC7A5*. Sin embargo, la expresión de *SLC7A5* se encuentra inducida de manera más evidente por la quimera HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) (Figura 6B).

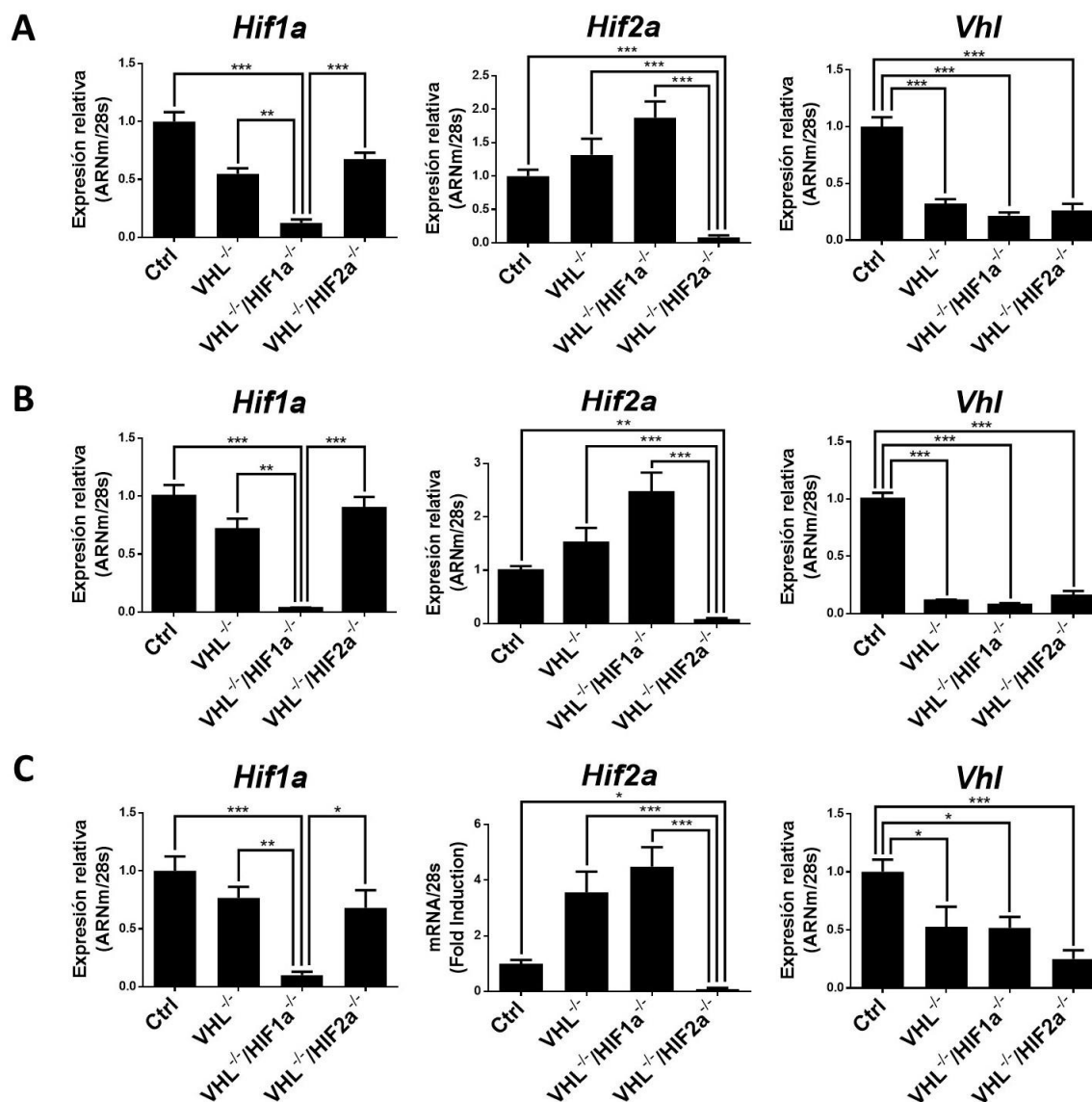
Por lo tanto, nuestros datos sugieren que de manera general los genes que se regulan específicamente por HIF1 $\alpha$  en células WT8 requieren tanto la región de unión a ADN bHLH-PAS como la región de transactivación NTAD/CTAD de HIF1 $\alpha$ , mientras que la región de transactivación de HIF2 $\alpha$  parece ser más relevante que la región bHLH-PAS para explicar la inducción de la expresión de genes específicos de HIF2 $\alpha$  como es el caso del transportador de aminoácidos *SLC7A5* (LAT1). Sin embargo, sí debe comentarse que la contribución relativa de la región de transactivación de HIF2 $\alpha$  puede ser diferente en función de cada gen dependiente de HIF2 $\alpha$  siendo una contribución completa en el caso de *PHD3*, pero más limitada en el resto de los genes dependientes de HIF2 $\alpha$  analizados.



**Figura 6. Actividad transcripcional específica de HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> y las versiones quiméricas HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1), HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) en células WT8.** (A) Expresión de ARN mensajero relativa de *BNIP3*, *PGM1* y *CAIX* en células WT8 control y células que expresan HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> y las versiones quiméricas HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) y HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2). (B) Expresión génica relativa de *PHD3*, *OCT-4*, *NDRG1*, *TGFA*, *GLUT1*, *CCND1* y *SLC7A5* en células WT8 control (n=6) y células que expresan HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> (n=6), HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> (n=6) y las versiones quiméricas HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) (n=6) y HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) (n=4). Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM (del inglés: *Standard Error of the Mean*). El análisis estadístico se llevó a cabo usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey post hoc \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 y \*\*\* p < 0.001. Se indica si es significativo con el grupo control.

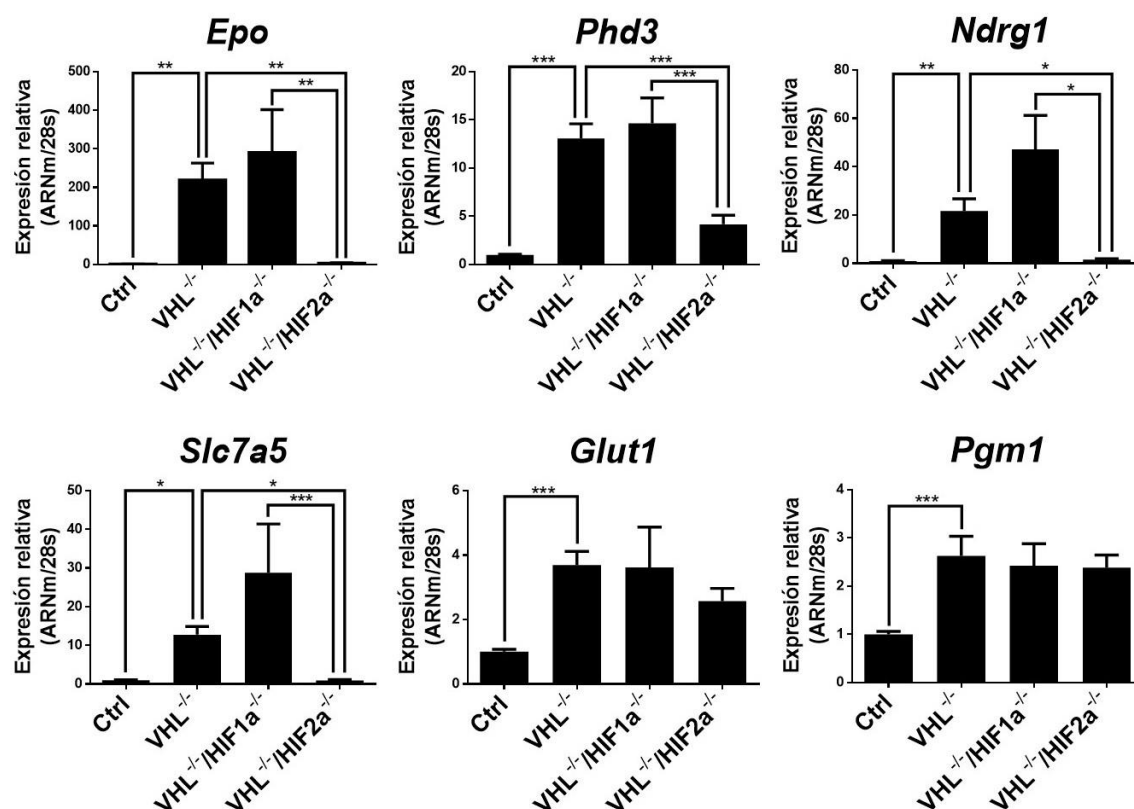
## 2. Actividad transcripcional específica de las isoformas HIF1 $\alpha$ y HIF2 $\alpha$ *in vivo*.

Además de analizar la actividad transcripcional específica de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  *in vitro* en células WT8, nos planteamos estudiar esta especificidad de las isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  *in vivo* en hígado, riñón y pulmón de ratón. Para ello, utilizamos ratones adultos *UBC-cre-ERT<sup>2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup>* (en adelante referido como *Vhl<sup>-/-</sup>*), en los que la expresión de *Vhl* puede ser inactivada globalmente tras la administración de tamoxifeno, que



**Figura 7.** Inactivación de *Vhl*, *Hif1 $\alpha$*  y *Hif2 $\alpha$*  en animales *Vhl<sup>-/-</sup>*, *Vhl<sup>-/-</sup>Hif1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* y *Vhl<sup>-/-</sup>Hif2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>*. Expresión relativa de *Vhl*, *Hif1 $\alpha$*  y *Hif2 $\alpha$*  en hígado (A), riñón (B) y pulmón (C) de animales *Vhl<sup>-/-</sup>* (n=4-14), *Vhl<sup>-/-</sup>Hif1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* (n=3-7), *Vhl<sup>-/-</sup>Hif2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* (n=5-12) y sus correspondientes controles (n=5-18). El análisis estadístico se llevó a cabo usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey post hoc \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 y \*\*\* p < 0.001.

permite la traslocación de la recombinasa cre al núcleo y así deletar la región del locus de *Vhl* entre dos sitios LoXP que flanquean el exón 1 de *Vhl*. La inactivación de *Vhl* permite la estabilización constitutiva de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  (Elorza et al., 2012; Miró-Murillo et al., 2011). Además, también utilizamos ratones *UBC-cre-ER<sup>T2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup> Hif1 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* y *UBC-cre-ER<sup>T2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup> Hif2 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* (en adelante referidos como *Vhl<sup>-/-</sup>*, *Hif1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* y *Vhl<sup>-/-</sup>Hif2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* respectivamente), en los que se puede inactivar simultáneamente *Vhl* y *Hif1 $\alpha$*  o *Vhl* y *Hif2 $\alpha$*  para investigar el papel relativo de cada isoforma en la inducción de diversos genes dependientes de HIF. En la Figura 7 se puede observar que se consiguió reducir eficazmente la expresión tanto de *Vhl* como de las dos isoformas *Hif1 $\alpha$*  y *Hif2 $\alpha$*  en hígado, riñón y pulmón, en los diferentes grupos de ratones analizados, comparando su expresión con los ratones control (Ctrl). El primer gen en el que analizamos los niveles de ARNm como control positivo en estos modelos fue el de eritropoyetina (*Epo*).

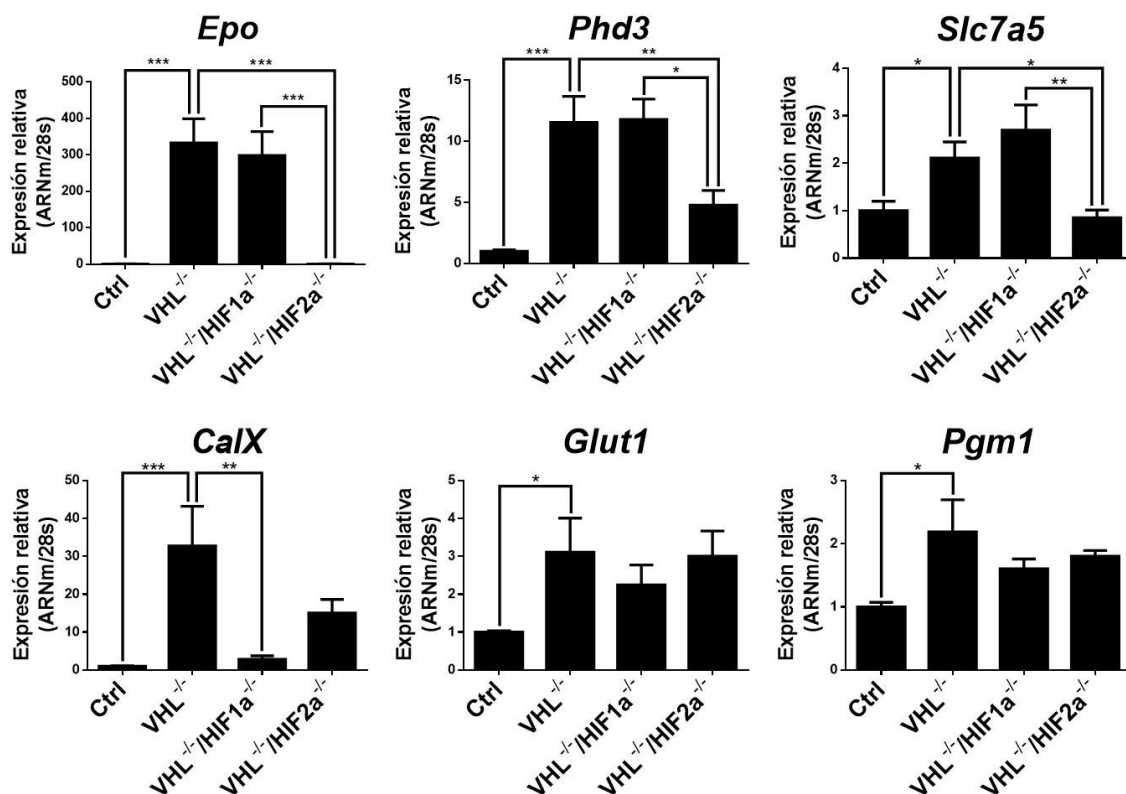


**Figura 8. Expresión de genes dependientes de HIF en el hígado de animales *Vhl<sup>-/-</sup>*, *Vhl<sup>-/-</sup>Hif1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>*, *Vhl<sup>-/-</sup>Hif2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>*.** Expresión relativa de *Epo*, *Phd3*, *Ndrgr1*, *Slc7a5*, *Glut1* y *Pgm1* en el hígado de animales *Vhl<sup>-/-</sup>* (n=13-14), *Vhl<sup>-/-</sup>Hif1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* (n=5-7), *Vhl<sup>-/-</sup>Hif2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* (n=12) y sus correspondientes controles (n=15-18). El análisis estadístico se llevó a cabo usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey post hoc \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 y \*\*\* p < 0.001.



En línea con estudios previos, observamos que los niveles de ARNm de *Epo* se encuentran altamente inducidos en los hígados (Figura 8) y riñones (Figura 9) de los animales *Vhl*<sup>-/-</sup> y *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup> pero no en los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α*<sup>-/-</sup>, en línea con el papel bien conocido de HIF2α en la expresión de *EPO* tanto en tejido renal como hepático (Kobayashi et al., 2017; Minamishima & Kaelin, 2010; Rankin et al., 2007; Scortegagna et al., 2003).

Una vez analizados los niveles de *Epo* como control positivo, analizamos posteriormente la expresión de *Slc7a5*. La expresión de *Slc7a5* es más alta en hígado, riñón y pulmón en los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup> y que de nuevo esta inducción se impedía en los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α*<sup>-/-</sup> mientras que no se inhibía - sino que más bien tenía una tendencia a inducirse algo más - en los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup> (Figuras 8-10). Por lo tanto, en línea con los datos obtenidos en WT8, *Slc7a5* se regulaba preferentemente por HIF2α - y no HIF1α - en diferentes tejidos.



**Figura 9. Expresión de genes dependientes de HIF en el riñón de animales *Vhl*<sup>-/-</sup>, *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup>, *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α*<sup>-/-</sup>.** Expresión relativa de *Epo*, *Phd3*, *Ndr1*, *Slc7a5*, *Glut1* y *Pgm1* en el riñón de animales *Vhl*<sup>-/-</sup> (n=6), *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup> (n=3), *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α*<sup>-/-</sup> (n=5) y sus correspondientes controles (n=8-10). El análisis estadístico se llevó a cabo usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey post hoc \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 y \*\*\* p < 0.001.

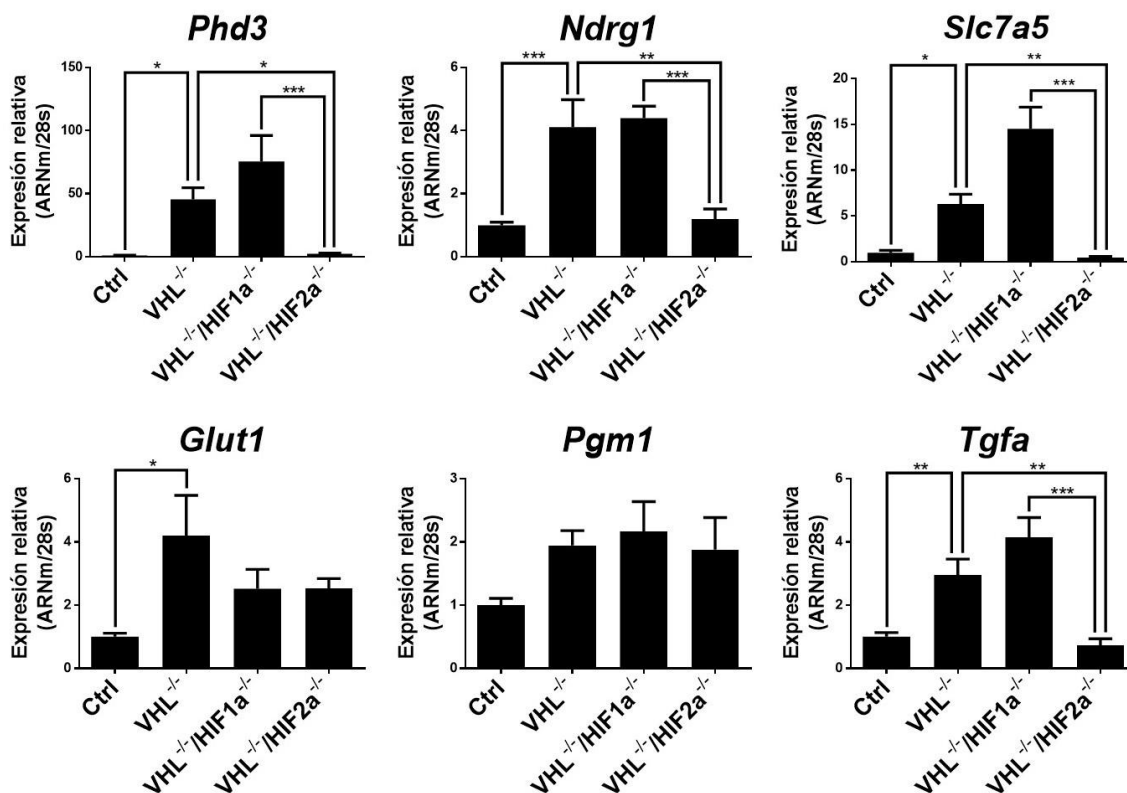


También analizamos la expresión de *Phd3* que se induce de manera consistente en hígado, riñón y pulmón de los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup> (Figuras 8-10) y que esta inducción - al igual que la de *Slc7a5* - se reducía específicamente en ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α*<sup>-/-</sup> pero no en ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup> lo que indica que la inducción de *Phd3* por inactivación de *Vhl* *in vivo* está controlada principalmente por la isoforma HIF2α en hígado, riñón y pulmón (Figuras 8-10) de manera similar a los datos obtenidos en WT8 (Figura 6B).

Por otro lado, algunos genes dependientes de HIF2α en WT8 como *Tgfa* también se inducían vía HIF2α en los animales *Vhl*<sup>-/-</sup> pero no en todos los tejidos. En este sentido se observa un aumento en los niveles de *Tgfa* únicamente en pulmón de los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>, pero no en hígado y riñón. Esta inducción de *Tgfa* en pulmón se anula en los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α*<sup>-/-</sup> - pero no en los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup> - indicando que HIF2α controla la expresión de *Tgfa* al igual que en las células WT8, pero recalcar de nuevo que únicamente en pulmón (Figura 10). Otro gen controlado por HIF2α - pero no en todos los tejidos analizados - es *Ndr1*, ya que su expresión se eleva en el hígado y pulmón de los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup> y *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup> y se ve anulada en los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α*<sup>-/-</sup> (Figuras 8, 10). En un análisis en paralelo no encontramos una inducción significativa de *Ndr1* en riñón (Expresión relativa de ARNm de *Ndr1*; media ± SEM Ctrl: 1±0,11 frente a *Vhl*<sup>-/-</sup>: 2,60±1,27 p=0,2654). Por lo tanto, la expresión de *Tgfa* y *Ndr1* es específica de HIF2α tanto *in vivo* como en WT8, pero la inducción de estos genes no se aprecia en todos los tejidos analizados como sí es el caso de *Slc7a5* y *Phd3*. Por último, otro de los genes preferentemente inducidos por HIF2α en células WT8 es *Glut1*. La expresión de *Glut1* se encuentra inducida en hígado, riñón y pulmón de los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, aunque es cierto que existe una tendencia a la disminución de la expresión en el hígado de los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α*<sup>-/-</sup>, en el riñón de los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup> y ambos genotipos en pulmón, estas diferencias no son significativas (Figuras 8-10) sugiriendo que - a diferencia de las células WT8 - la expresión de *Glut1* puede estar igualmente controlada por ambas isoformas *in vivo*.

En cuanto a los genes dependientes de HIF1α en las células WT8, mencionar que la expresión de CAIX aumenta notablemente en los riñones de ratones *Vhl*<sup>-/-</sup> y se observa una mayor reducción de la expresión en los riñones de los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup> que en los *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α* (Figura 9). Estos datos sugieren que, como en el caso de WT8, HIF1α tiene un papel relevante en la expresión de CAIX en los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup> aunque no se puede descartar una cierta participación de HIF2α. Por otro lado, la expresión de la enzima fosfoglucomutasa mutasa 1 (*Pgm1*) muestra una inducción significativa en el hígado y riñón de los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup> (Figuras 8-9) y una clara tendencia en el pulmón de los *Vhl*<sup>-/-</sup> (Figura 10). De manera similar a *Glut1* la expresión de *Pgm1* no se afecta

cuando comparamos ratones *Vhl*<sup>-/-</sup> con *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup> y *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α*<sup>-/-</sup> en todos los tejidos analizados (Figuras 8-10). Estos datos podrían sugerir que - al igual que *Glut1* - ambas isoformas de HIF pueden contribuir en el control de la expresión de *Pgm1* en los ratones *Vhl*<sup>-/-</sup> y que por lo tanto la especificidad observada en el sistema WT8 no parece mantenerse en otros sistemas experimentales *in vivo*.



**Figura 10. Expresión de genes dependientes de HIF en el pulmón de animales *Vhl*<sup>-/-</sup>, *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup>, *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α*<sup>-/-</sup>.** Expresión relativa de *Epo*, *Phd3*, *Ndr1*, *Slc7a5*, *Glut1* y *Pgm1* en el pulmón de animales *Vhl*<sup>-/-</sup> (n=4-6), *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1α*<sup>-/-</sup> (n=5), *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2α*<sup>-/-</sup> (n=7) y sus correspondientes controles (n=5-6). El análisis estadístico se llevó a cabo usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey post hoc \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 y \*\*\* p < 0.001.

Estos datos conjuntamente muestran una contribución diferente de las regiones bHLH-PAS y NTAD/CTAD de las isoformas HIF1α y HIF2α en la actividad específica sobre sus genes diana. Además, indican que (i) la propia inducción, así como (ii) la selectividad de los factores HIF se conserva en algunos genes como *SLC7A5* y *PHD3*, pero no en otros como *GLUT1* o *PGM1*, cuando comparamos los tejidos de nuestro modelo *in vivo* de ganancia de función basado en la deficiencia de *Vhl* y el modelo de carcinoma renal *in vitro* de la línea celular WT8.

## PARTE II

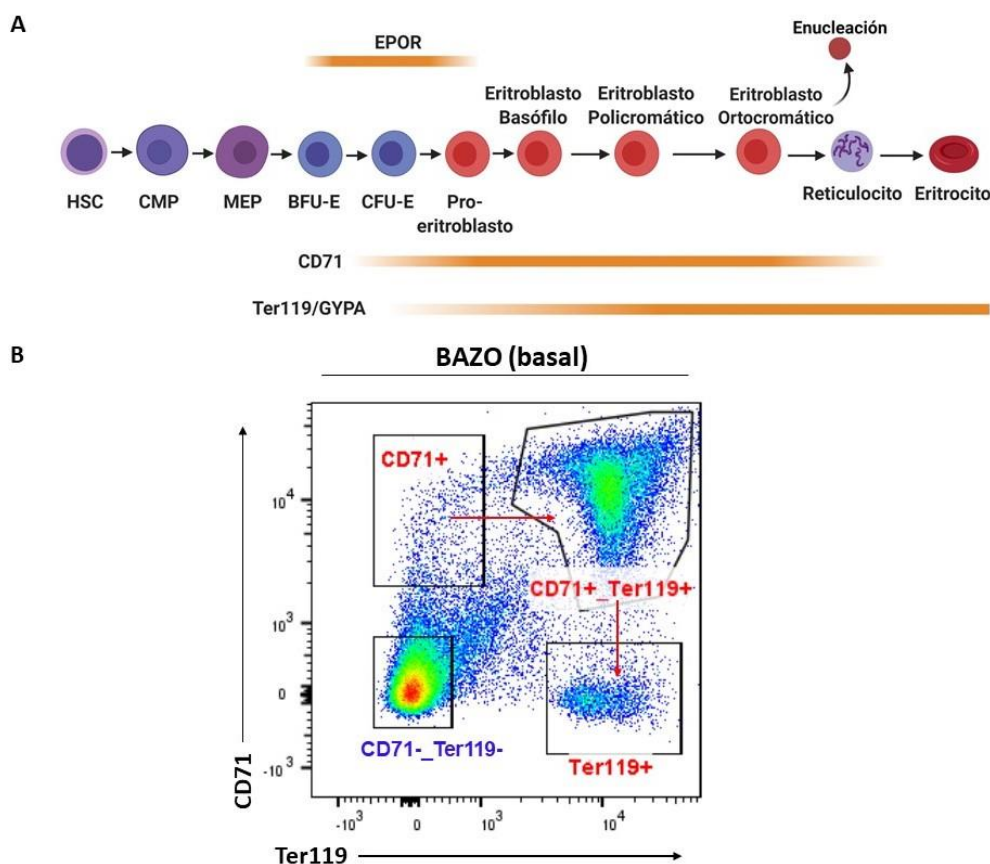
### 1. Expresión basal del transportador de aminoácidos LAT1/CD98 en células del linaje eritroide.

[Nota previa: A lo largo de este trabajo nos referimos a SLC7A5 y LAT1 indistintamente. SLC7A5 se refiere al gen que codifica LAT1 como proteína].

La expresión de LAT1 se encuentra elevada en células tumorales (Cormerais et al., 2016; Elorza et al., 2012; Fuchs & Bode, 2005; Sampredo-Núñez et al., 2020), así como en linfocitos T en el contexto de la patología inflamatoria (Cibrian et al., 2016, 2020; Sinclair et al., 2013) pero la expresión basal de LAT1, así como su papel fisiológico basal permanece bastante desconocido. Teniendo en cuenta que el linaje eritroide está en continua renovación y, por lo tanto, proliferación, decidimos evaluar la expresión de LAT1 en los precursores eritroides en condiciones basales. Para ello analizamos, por citometría de flujo, las diferentes poblaciones del linaje eritroide presentes en los bazos de ratones control que pueden distinguirse mediante el marcaje de CD71 (receptor de transferrina) y Ter119 (Glicoforina A murina) (Figura 11, esta figura incluye aquí en Resultados un esquema similar al de la Figura 4 para facilitar la comprensión de los datos de citometría). Estos marcadores nos permiten distinguir en primer lugar un grupo de células positivas para CD71 (CD71+) pero sin expresión (o muy baja) de Ter119 que son los precursores eritroides más inmaduros tales como los denominados BFU-E, CFU-E y proeritroblastos (Figura 11) (Chen et al. 2009). Además, se distingue un estadio más avanzado en la maduración que son las células doble positivas (CD71+/Ter119+) que pueden incluir - por este orden de diferenciación - eritroblastos basófilos, policromáticos, ortocromáticos así como precursores que han expulsado su núcleo que se conocen con el nombre de reticulocitos (Figura 11) (Chen et al., 2009; Tauzin et al., 2018). Además, este análisis también detecta el estadio más avanzado de diferenciación que incluye células Ter119 positivas y negativas para CD71 (CD71-/Ter119+), que incluye los propios eritrocitos ya maduros (Figura 11). Por último, este análisis detecta células CD71-/Ter119- doble negativas que incluye células que no pertenecen al linaje eritroide que también están presentes en el bazo que en principio pueden incluir linfocitos B y T, macrófagos o células endoteliales (Figura 11).

Con este tipo de análisis por citometría evaluamos en primer lugar la expresión de CD98 que es la cadena pesada del heterodímero LAT1/CD98. Para ello incorporamos un tercer anticuerpo marcado en APC frente a la cadena CD98. Como control negativo utilizamos un anticuerpo IgG-APC. Este análisis reveló en primer lugar que los

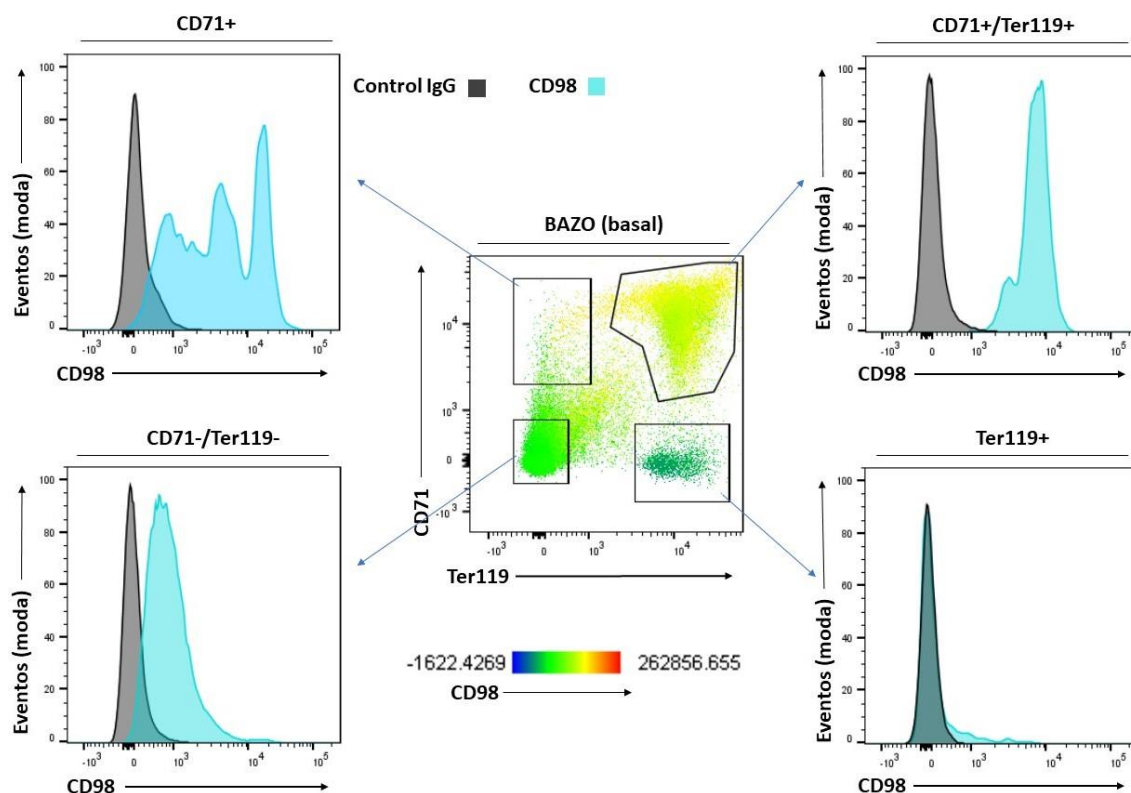
precursores más inmaduros CD71+/Ter119- presentan un patrón más heterogéneo donde se pueden apreciar células con expresión alta, intermedia y baja de CD98 (Figura 12).



**Figura 11. Estadios de diferenciación del linaje eritroide en función de los marcadores de superficie CD71 y Ter119.** (A) Esquema - similar al de la Figura 4 de la introducción - que muestra la diferenciación del linaje eritroide en base a la expresión de los marcadores de superficie CD71, Ter119 y EPOR. La barra nítida indica alta expresión del marcador, la barra difuminada indica baja expresión. Abreviaturas en inglés: HSC, *hematopoietic stem cell*; CMP, *common myeloid progenitor*; MEP, *megakaryocyte-erythroid progenitor*; BFU-E, *burst-forming unit, erythroid*; CFU-E, *colony-forming unit, erythroid*, EPOR, *erythropoietin receptor*. (B) El panel representa un análisis por citometría de flujo en células del bazo donde pueden apreciarse los diferentes estadios de diferenciación de linaje eritroide mediante el análisis de la expresión en superficie de CD71 y Ter119. Las flechas indican el orden de progresión en la maduración de los diferentes estadios de diferenciación eritroide (en rojo) desde (i) CD71+ a (ii) CD71+/Ter119+ y finalmente (iii) Ter119+. El panel también indica las células CD71-/Ter119- (en azul) presentes en el bazo y que no pertenecen al linaje eritroide. Experimento representativo de 23 realizados.

Por otro lado, CD98 se expresa de manera más prominente y homogénea en las células CD71+/Ter119+ doble positivas (Figura 12). Por el contrario, los eritrocitos ya maduros CD71-/Ter119+ presentan una expresión nula o mínima de CD98 (Figura 12)

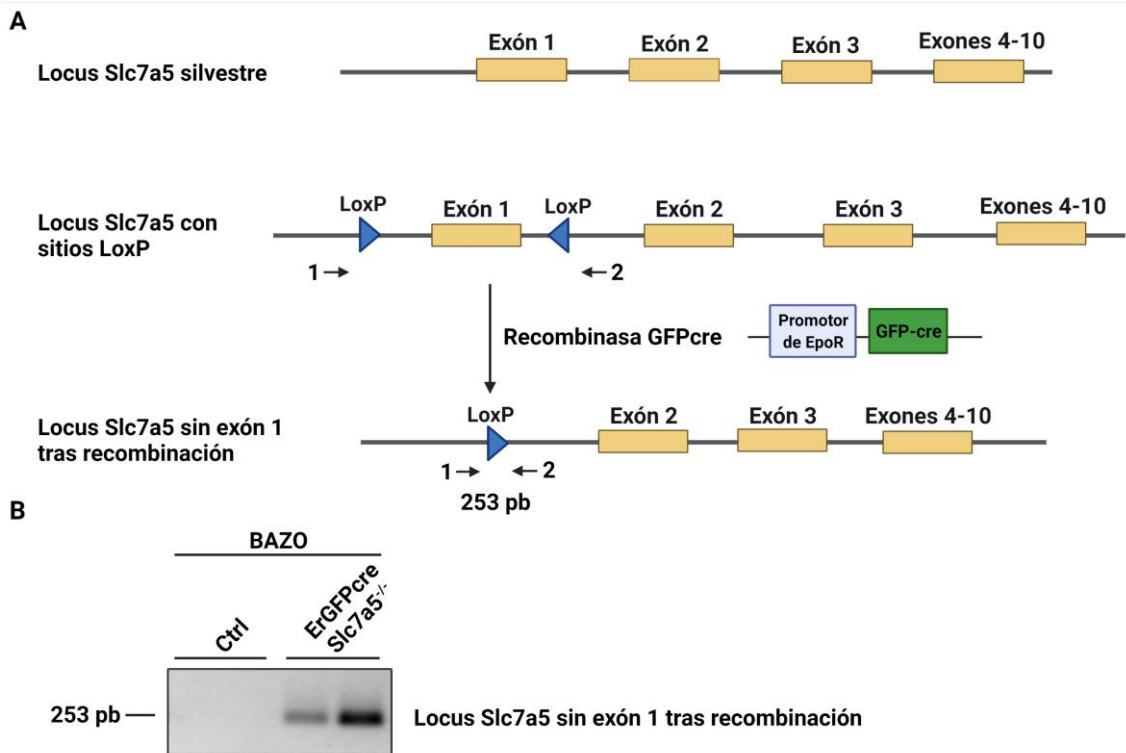
sugiriendo que el proceso de maduración de eritrocitos desde doble positivas (CD71+/Ter119+), hasta eritrocito, lleva asociado una disminución concomitante tanto de CD98 como de CD71. Además, detectamos que las células no eritroides presentes en el bazo CD71-/Ter119- también presentan una expresión constitutiva y homogénea de CD98, aunque con un nivel de expresión inferior a las células eritroides CD71+/Ter119+ doble positivas (Figura 12).



**Figura 12. Expresión basal de CD98 en los diferentes estadios de diferenciación del linaje eritroide en el bazo.** En el panel central se representan las cuatro poblaciones características del bazo (condiciones basales) en función de la expresión de CD71 y Ter119 donde se diferencia la expresión de CD98 en función de un código de colores (amarillo expresión más alta y azul-verde oscuro expresión más baja o nula). Alrededor del panel central se representan los histogramas de expresión (representado en moda) de CD98 (azul) con control IgG (negro) en bazo (en condiciones basales) en las poblaciones (i) CD71+, (ii) CD71+/Ter119+, (iii) Ter119+ y (iv) CD71-/Ter119-. Experimento representativo de 23 realizados.

El anticuerpo utilizado para este análisis - como se ha mencionado anteriormente - detecta CD98 que corresponde a la cadena pesada del heterodímero LAT1/CD98. Sin embargo, CD98 no solo heterodimeriza con LAT1 sino con otros transportadores de aminoácidos (ver introducción). Por lo tanto, el anticuerpo utilizado en principio puede detectar, no solo el heterodímero LAT1/CD98 sino también otros heterodímeros donde participa CD98. Para asegurar que la señal detectada con nuestro anticuerpo es

realmente atribuible al heterodímero LAT1/CD98 utilizamos ratones *Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* en los que el exón 1 de *Slc7a5* puede ser específicamente deletado (Poncet et al., 2014, 2020). En estos ratones una región genómica que incluye el exón 1 del locus de *Slc7a5* está flanqueada por dos sitios *LoxP* que permiten su inactivación mediante la expresión de la recombinasa cre (Figura 13A) (Poncet et al., 2014, 2020). Estos ratones se cruzaron posteriormente con una línea de ratón *ErGFPcre* que expresa la recombinasa cre bajo el control del promotor del receptor de eritropoyetina (*EpoR*) (Figura 13A) (Heinrich et al., 2004). Por lo tanto, esta línea inactiva regiones genómicas flanqueadas por sitios *LoxP* en células positivas para el receptor de EPO (*EpoR*) como son los precursores del linaje eritroide *ErGFPcre* (Heinrich et al., 2004). Debe destacarse que esta línea *ErGFPcre*, al inactivar genes en estos precursores, también desencadena su inactivación en todos los estadios posteriores de diferenciación del linaje eritroide (Heinrich et al., 2004). Por lo tanto, en el caso de los ratones *Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* esperábamos una delección del exón 1 del locus de *Slc7a5* en el linaje eritroide como se representa en la Figura 13A.



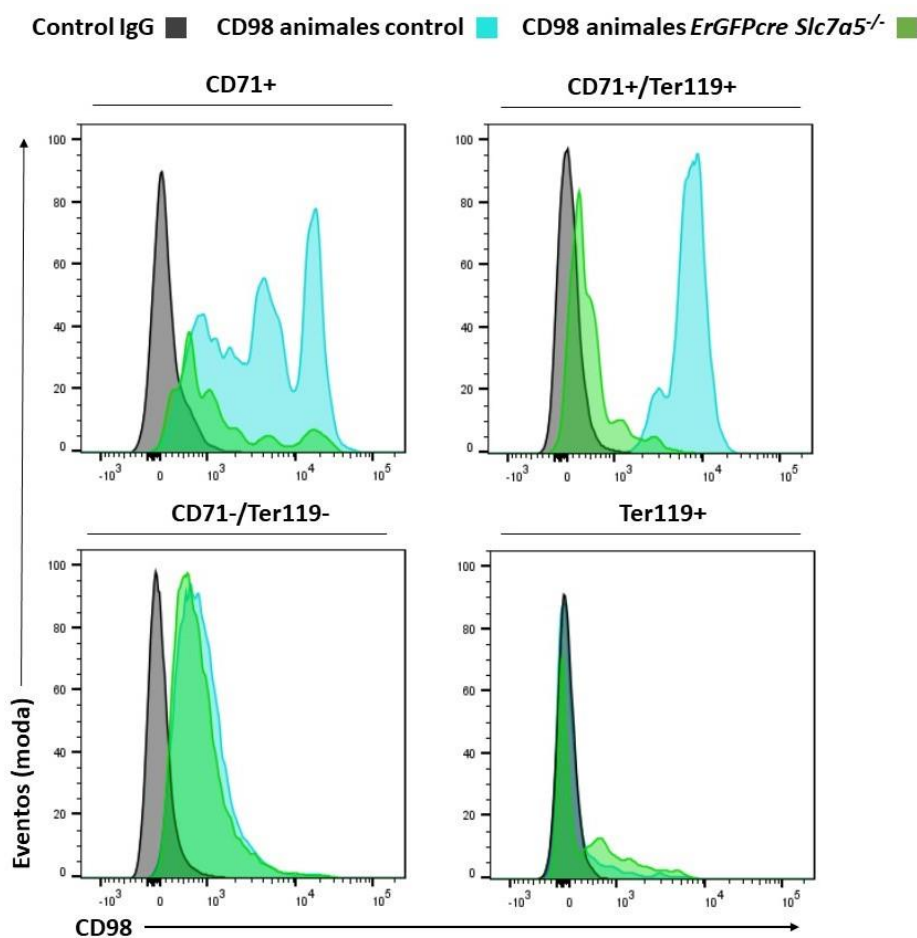
**Figura 13. Generación de ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* para inactivación de *Slc7a5* en el linaje eritroide.** (A) Representación del locus murino de *Slc7a5* en su forma silvestre (esquema superior), con los sitios *LoxP* insertados (esquema intermedio) y tras la recombinación (esquema inferior) mediada por la acción de la recombinasa cre cuya expresión está controlada por el promotor del receptor de Epo (*EpoR*). Se representan las posiciones donde hibridan los oligonucleótidos 1 y 2 que permiten detectar la delección del exón 1 mediante la aparición de un amplicón de 253 pares de bases (B) PCR convencional con los



oligonucleótidos 1 y 2 utilizando ADN genómico extraído del bazo de animales control y *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*.

Con el fin de comprobar la efectividad de la línea *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* para deletar la región genómica localizada entre los dos sitios LoxP en el locus de *Slc7a5* analizamos el ADN genómico de bazos de ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* y ratones control (Figura 13B). Para este análisis empleamos los oligonucleótidos 1 y 2 indicados en la (Figura 13A). Estos oligonucleótidos amplificaban una banda de 253 pb - exclusivamente en los bazos de los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* - lo que es indicativo de la delección del exón 1 del locus de *Slc7a5* situados entre los dos sitios LoxP (Figura 13B).

Una vez comprobado que el modelo animal promovía la eliminación del locus silvestre para *Slc7a5* procedimos a comprobar si la señal por citometría de flujo detectada con nuestro anti-CD98 correspondía al heterodímero LAT1/CD98. Efectivamente pudimos comprobar que la señal del anticuerpo en células CD71+/Ter119- y células doble positivas CD71+/Ter119+ se perdía en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (Figura 14 comparando perfil azul claro de la señal de ratones control con perfil verde de la señal de *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*). Esta pérdida de señal es muy marcada, indicando probablemente que LAT1 es la subunidad preponderante que heterodimeriza con CD98 en precursores eritroides en condiciones basales. En línea con los datos mostrados anteriormente, los eritrocitos maduros CD71-/Ter119+ presentan una expresión nula o mínima de CD98 tanto en los ratones control como en estos ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (Figura 14). Por último, mencionar que la pérdida de LAT1 es específica ya que la señal detectada con nuestro anti-CD98 no se pierde en las células CD71-/Ter119- doble negativas correspondientes a células que no pertenecen al linaje eritroide presentes en el bazo (Figura 14).

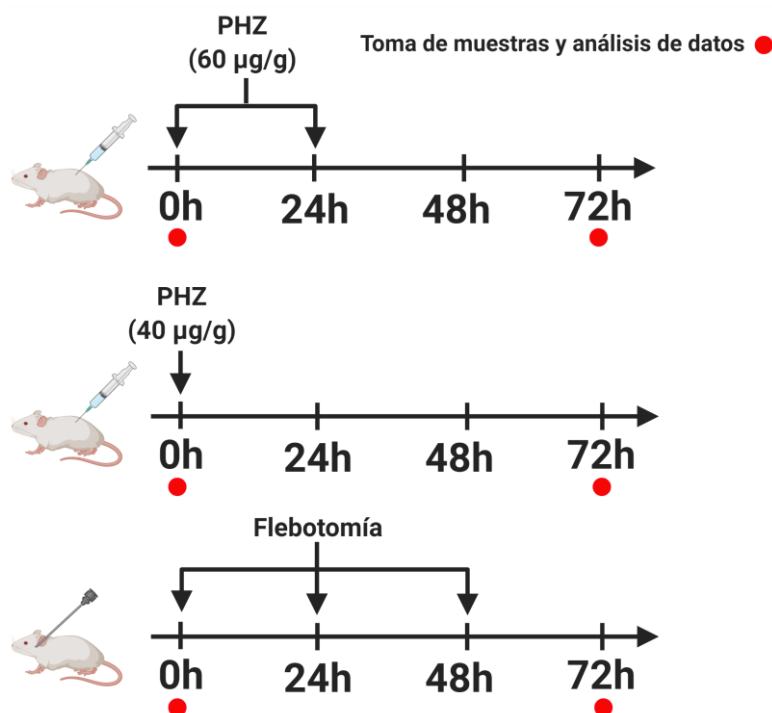


**Figura 14. Comparativa de la expresión basal de CD98 (LAT1/CD98) en los diferentes estadios de diferenciación del linaje eritroide en bazo de animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* y animales control.** Histogramas de expresión (representado en moda) de CD98 en animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (verde) y en animales control (azul) con control IgG (negro) en las poblaciones CD71+, CD71+/Ter119+, Ter119+ y CD71-/Ter119-. Experimento representativo de 18 realizados.

## 2. LAT1/CD98 en progenitores eritroides esplénicos en condiciones de estrés eritropoyético (modelos de anemia).

Aunque la expresión de LAT1/CD98 ya se detecta en los precursores eritroides en condiciones basales, quisimos evaluar si su expresión se inducía en condiciones de estrés eritropoyético. Para ello, empleamos diferentes modelos de anemia tales como la administración de fenilhidrazina (PHZ) o la flebotomía (pérdida de sangre) (Figura 15).



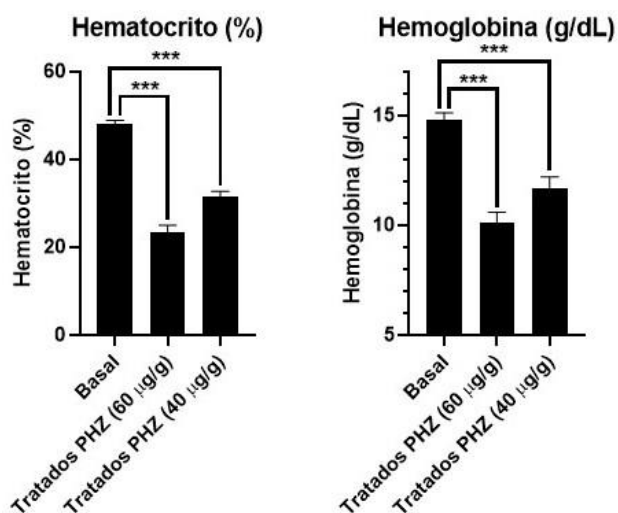


**Figura 15. Modelos de anemia empleados en este estudio.** Se indican con flechas (hacia abajo) los días en los que se administra fenilhidrazina o se realiza la flebotomía durante el curso del experimento. Se indica con un punto rojo los tiempos de extracción de sangre o de tejidos (tejidos solo en el segundo punto rojo) para realizar medidas hematológicas, análisis por citometría de flujo, EPO circulante en suero por ELISA y expresión de ARNm de *Epo* en riñón.

#### *Modelo de anemia aguda por fenilhidrazina (PHZ) con dos dosis de 60 µg/g*

La administración de fenilhidrazina (PHZ) es un modelo de anemia hemolítica aguda. La fenilhidrazina produce un estrés oxidativo que desencadena la peroxidación de lípidos en la membrana de los eritrocitos, así como la oxidación de la oxihemoglobina que da a lugar a la formación de metahemoglobina. Estos efectos desencadenan la desnaturalización irreversible de la hemoglobina (formación de hemicromos) y la generación de cuerpos de Heinz que son detectados por los macrófagos que fagocitan estos eritrocitos dañados (Rifkind, 1965). Iniciamos nuestros análisis - en línea con otros estudios - utilizando la administración de PHZ 60 µg/g 2 días consecutivos (Figura 15). Dos días después de la administración de la última dosis de PHZ se apreciaba una bajada significativa de hematocrito y de hemoglobina en sangre periférica (Figura 16). Esta condición genera un escenario de hipoxia tisular que activa la producción de EPO en el riñón cuando se compara con los ratones no tratados (Expresión relativa de ARNm de *Epo*; media  $\pm$  SEM: Control:  $1 \pm 0$  frente a tratados (PHZ 60 µg/g):  $15,49 \pm 4,92$   $p=0,0258$ ). En condiciones de estrés eritropoyético - como el inducido por la fenilhidrazina - el bazo juega un papel relevante en mantener la

eritropoyesis dependiente de EPO (Paulson et al., 2011, 2020). En este sentido el tratamiento con PHZ desencadena una marcada esplenomegalia (Peso de bazo; media  $\pm$  SEM Basal:  $0,09\pm 0,01$  frente a tratado (PHZ 60  $\mu\text{g/g}$ ):  $0,21\pm 0,01$   $p < 0,0001$ ) asociada en gran medida a una marcada expansión de los precursores eritroides especialmente los CD71+/Ter119+ doble positivos (Figura 17).



**Figura 16. Medidas de hematocrito y hemoglobina en condiciones basales tras el tratamiento con PHZ.** Se representa hematocrito y hemoglobina de animales en condiciones basales ( $n=25$ ) y animales tratados con PHZ con 2 dosis de 60  $\mu\text{g/g}$  ( $n=7$ ) o 1 dosis de 40  $\mu\text{g/g}$  ( $n=16$ ). El análisis estadístico se llevó a cabo usando t de student seguido de corrección de Welch comparando cada condición con el control \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### *Modelo de anemia aguda por fenilhidrazina (PHZ) con una dosis de 40 $\mu\text{g/g}$*

Dado que la doble administración de PHZ de 60  $\mu\text{g/g}$  es especialmente agresiva y disminuye el hematocrito a valores cercanos a 20% quisimos evaluar un modelo más moderado con una sola administración de PHZ de 40  $\mu\text{g/g}$ . Con este modelo observamos una caída tanto de hematocrito a valores más cercanos a 30% así como una caída de la hemoglobina menos acusada (Figura 16). Este modelo también cursa con una elevación de los niveles de ARNm de *Epo* en el riñón (Expresión relativa de ARNm de *Epo*; media  $\pm$  SEM: Control:  $1\pm 0$  frente a tratados (PHZ 40  $\mu\text{g/g}$ ):  $5,38\pm 1,98$   $p=0,0489$ ) así como una marcada esplenomegalia (Peso de bazo; media  $\pm$  SEM: Basal:  $0,12\pm 0,02$  frente a tratado (PHZ 40  $\mu\text{g/g}$ ):  $0,25\pm 0,03$   $p=0,0023$ ).

#### *Modelo de anemia aguda por flebotomía.*

Otro modelo de anemia empleado es la flebotomía en la que se sangra a los ratones durante 3 días seguidos. De manera similar al tratamiento con PHZ observamos

también una bajada de hematocrito (Hematocrito; media  $\pm$  SEM: Basal:  $45,41 \pm 1,60$  Tratados:  $29,60 \pm 4,18$   $p=0.0276$ ) y hemoglobina (Hemoglobina; media  $\pm$  SEM: Basal:  $14,66 \pm 0,53$  Tratados:  $9,20 \pm 1,35$   $p=0.0201$ ) como consecuencia de la pérdida de sangre.

### 2.1. Expresión de LAT1/CD98 en progenitores eritroides esplénicos en condiciones de estrés eritropoyético.

A continuación, analizamos si la señal en citometría con nuestro anti-CD98 se inducía en células del linaje eritroide en el bazo, órgano central de la respuesta al estrés eritropoyético. Este análisis reveló que los precursores más inmaduros CD71+/Ter119- como los eritroblastos CD71+/Ter119+ doble positivos presentaban una mayor expresión de CD98 en condiciones de anemia cuando se comparaba con estas mismas células en los ratones control (Figura 17-18). Esta inducción era específica en el linaje eritroide ya que la señal de CD98 no se alteraba en las células no eritroides CD71-/Ter119- presentes en el bazo (Figura 17-18).

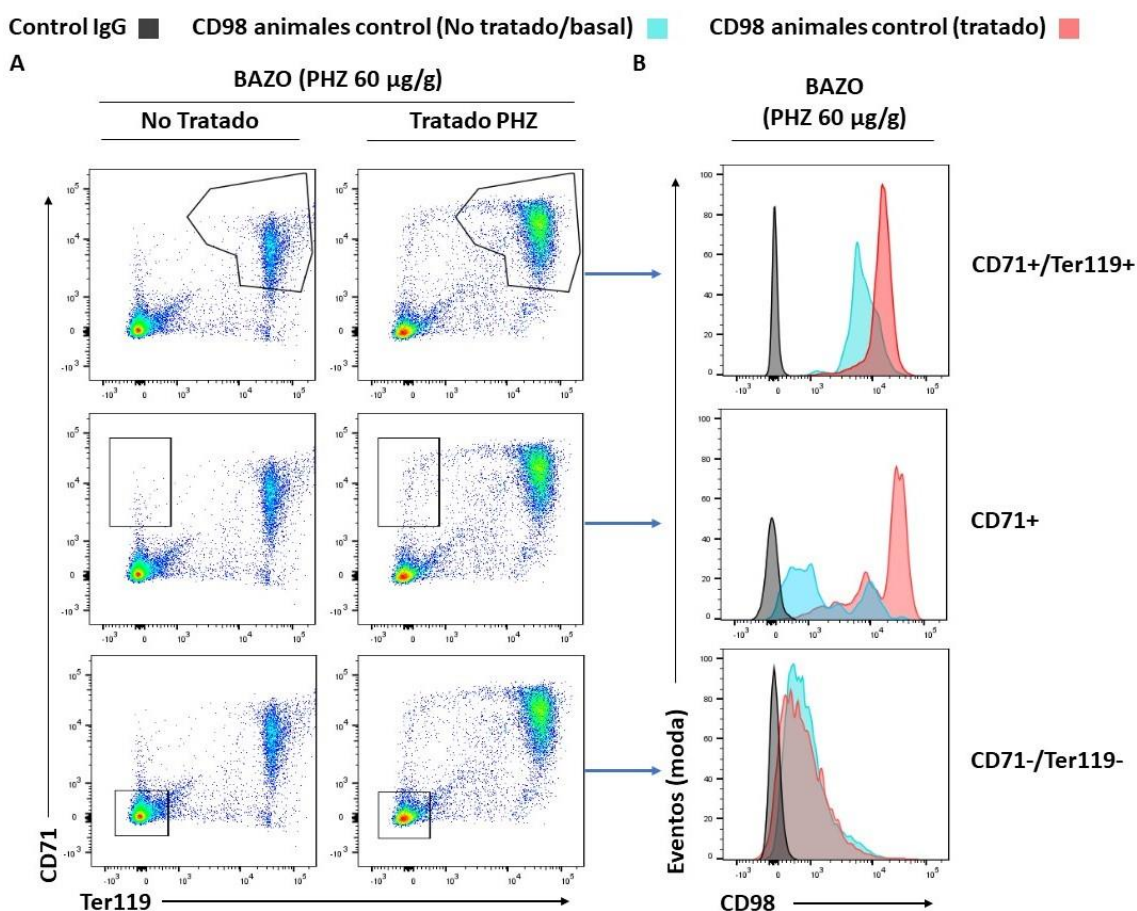
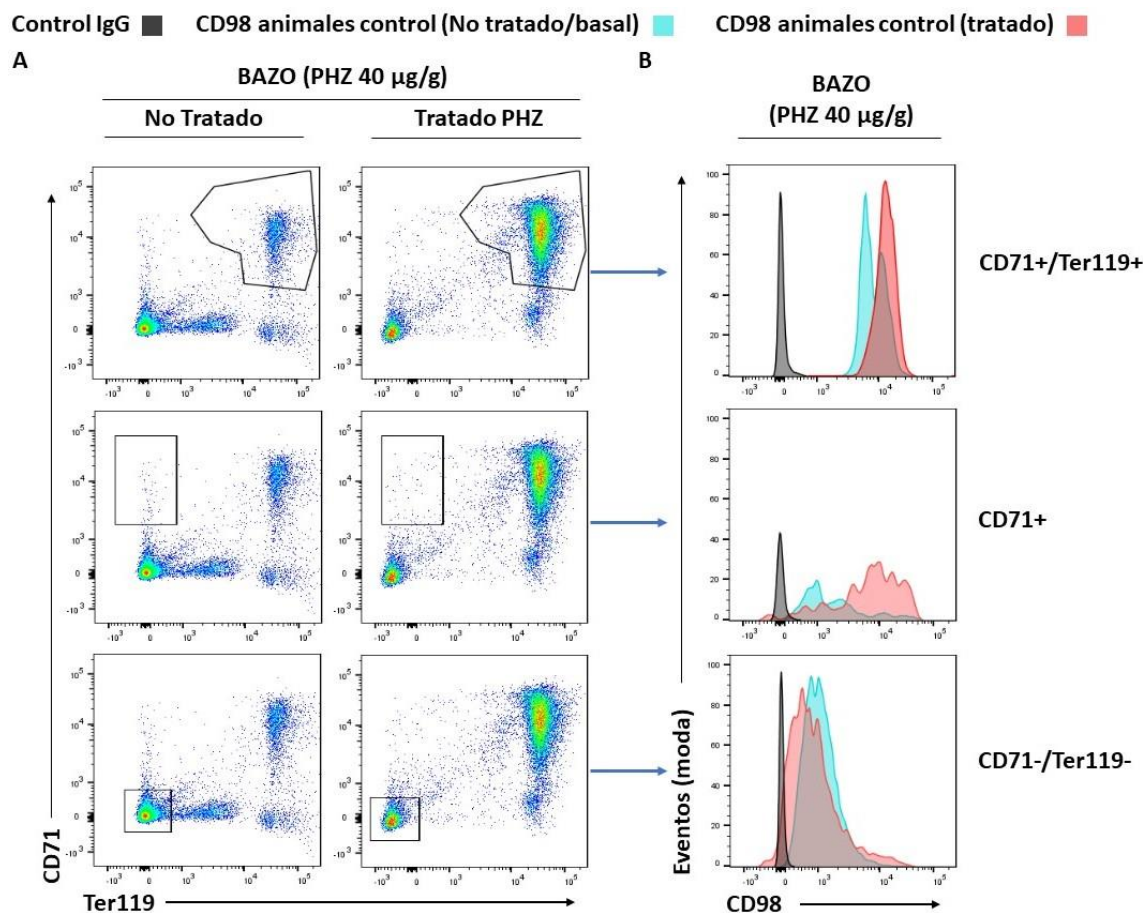


Figura 17. Expresión de CD98 (LAT1/CD98) en células CD71+/Ter119+, CD71+ y CD71-/Ter119- en bazo de animales control no tratados y tratados con PHZ. (A) Diagrama de puntos de expresión de

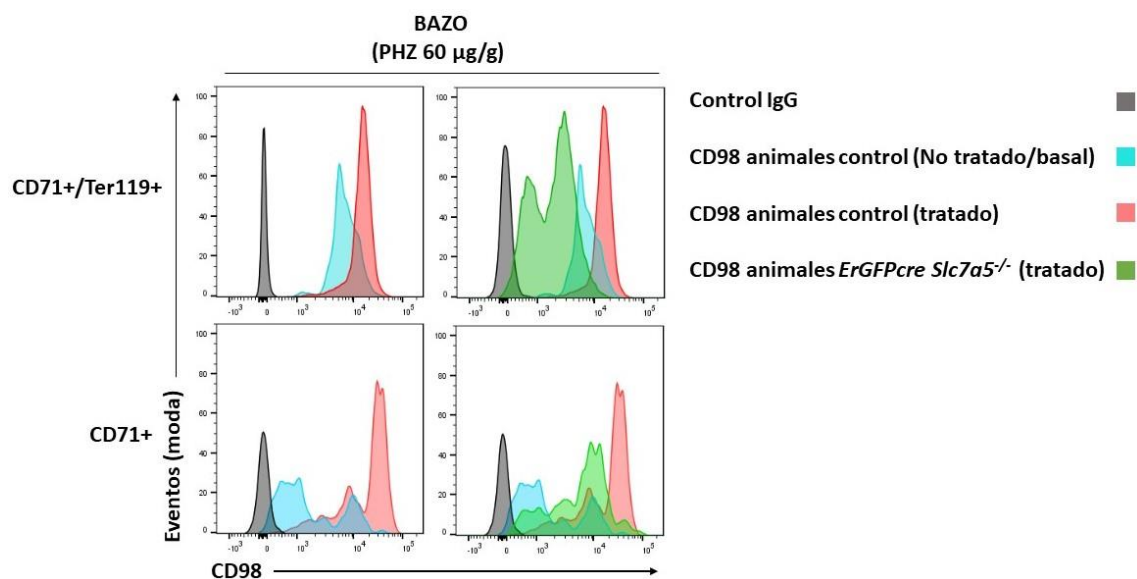
CD71 y Ter119 en bazo de ratón discriminando las poblaciones CD71+, CD71+/Ter119+ y CD71-/Ter119- en condiciones basales y tras tratamiento con PHZ (2 dosis 60 µg/g). (B) Histograma de expresión de CD98 (representado en moda) en las poblaciones CD71+/Ter119+, CD71+ y CD71-/Ter119- en animales control no tratados (azul) o tratados con PHZ (rojo). Control IgG-APC (negro). Experimento representativo de 5 realizados.



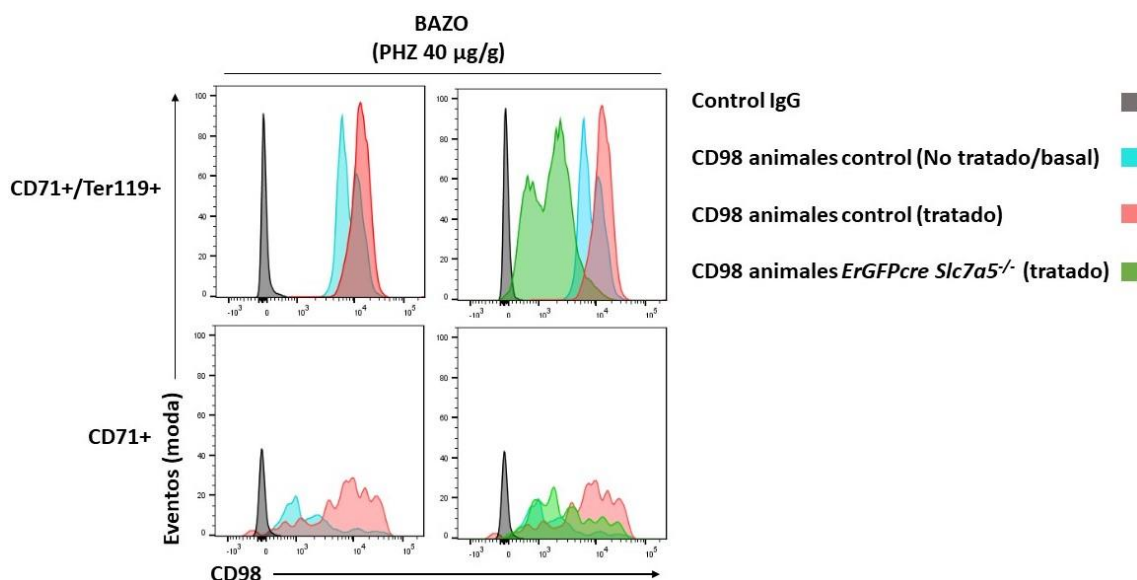
**Figura 18. Expresión de CD98 (LAT1/CD98) en células CD71+/Ter119+, CD71+ y CD71-/Ter119- en bazo de animales control no tratados y tratados con PHZ.** (A) Diagrama de puntos de expresión de CD71 y Ter119 en bazo de ratón discriminando las poblaciones CD71+, CD71+/Ter119+ y CD71-/Ter119- en condiciones basales y tras tratamiento con PHZ (1 dosis 40 µg/g). (B) Histograma de expresión de CD98 (representado en moda) en las poblaciones CD71+/Ter119+, CD71+ y CD71-/Ter119- en animales control no tratados (azul) o tratados con PHZ (rojo). Control IgG-APC (negro). Experimento representativo de 5 realizados.

De nuevo evaluamos si LAT1 contribuía a la expresión de CD98 en ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* sometidos a condiciones de anemia bajo tratamiento con PHZ de 60 µg/g o 40 µg/g. Pudimos comprobar que la expresión de CD98 disminuía en los precursores iniciales CD71+/Ter119- y CD71+/Ter119+ doble positivos del bazo en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* tratados con PHZ (Figura 19-20, comparar perfil rojo

de la señal de animales control tratados con PHZ con perfil verde de la señal en *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* tratados con PHZ).



**Figura 19. Expresión de CD98 (LAT1/CD98) en células CD71+/Ter119+ doble positivas y CD71+ en condiciones de estrés eritropoyético.** Histogramas de expresión de CD98 (representado en moda) de poblaciones CD71+/Ter119+ y CD71+ en bazo de animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (verde), animales control no tratados (azul) o tratados con PHZ (2 dosis de 60 µg/g) (rojo). Control IgG-APC (negro). Experimento representativo de 5 realizados.



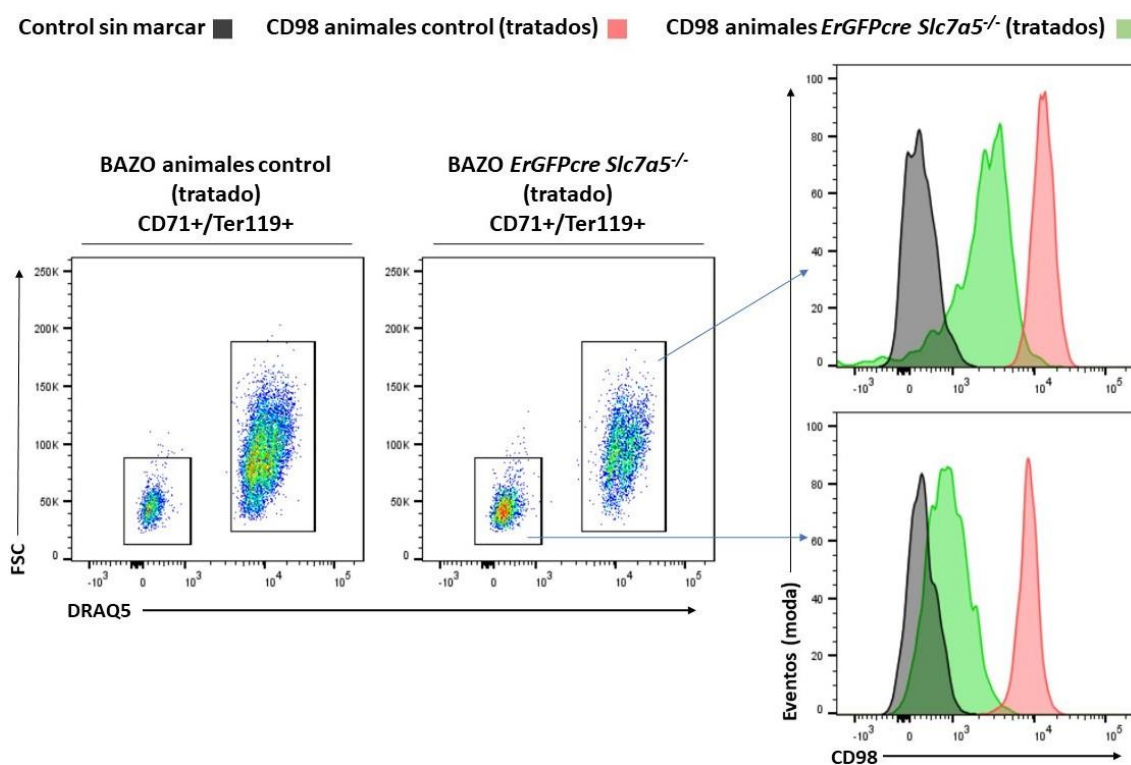
**Figura 20. Expresión de CD98 (LAT1/CD98) en células CD71+/Ter119+ doble positivas y CD71+ en condiciones de estrés eritropoyético.** Histogramas de expresión de CD98 (representado en moda) de poblaciones CD71+/Ter119+ y CD71+ en bazo de animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (verde), animales control no tratados (azul) o tratados con PHZ (1 dosis de 40 µg/g) (rojo). Control IgG-APC (negro). Experimento representativo de 5 realizados.

Sin embargo, la pérdida de CD98 fue parcial tanto en las células CD71+/Ter119- como en las doble positivas CD71+/Ter119+ indicando que en condiciones de anemia los eritroblastos expresan no solo LAT1/CD98 sino otros transportadores de aminoácidos que heterodimerizan con CD98. Un análisis más en detalle de las células CD71+/Ter119+ doble positivas parecía detectar (i) una población de células que tenía una pérdida de CD98 menos manifiesta y (ii) otra población en la que la pérdida de CD98 era más marcada (Figura 19-20). Estos datos nos llevaron a considerar si la pérdida de CD98 podría ser diferente en las distintas subpoblaciones que componen las células CD71+/Ter119+ doble positivas. A este respecto, los eritroblastos CD71+/Ter119+ doble positivos son un conjunto de varias poblaciones de precursores eritroides que se ordenan (en orden de diferenciación) como eritroblastos basófilos, policromáticos, ortocromáticos, todas ellas con núcleo, y un último estadio de reticulocitos enucleados (Chen et al., 2009; Tauzin et al., 2018). Los eritroblastos basófilos y policromáticos son de mayor tamaño que los ortocromáticos y reticulocitos que son de un tamaño menor (Chen et al., 2009). En base a esta información previa realizamos un análisis por citometría para analizar el tamaño (FSC) frente a la presencia de ADN/ARN empleando la sonda DRAQ5 en las células CD71+/Ter119+ doble positivas del bazo en condiciones de estrés eritropoyético. Este análisis indicó, efectivamente, la presencia de células CD71+/Ter119+ doble positivas del bazo positivas también para DRAQ5 (DRAQ5<sup>ALTO</sup>) en las que se apreciaban células de diferente tamaño (FSC) siendo probablemente eritroblastos basófilos/policromáticos los de mayor FSC y ortocromáticos los de menor FSC (Figura 21). Además, también detectamos células CD71+/Ter119+ de un FSC aún menor que las células nucleadas, y con una señal baja (no nula) de DRAQ5 (DRAQ5<sup>BAJO</sup>), característica de los reticulocitos que aún tienen ARN detectable por DRAQ5 (Figura 21) (Allan et al., 2008; Tauzin et al., 2018).

En base a esta información quisimos evaluar la pérdida de CD98 en los animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* tanto en las células CD71+/Ter119+ doble positivas nucleadas (DRAQ5<sup>ALTO</sup>) como en los reticulocitos CD71+/Ter119+ DRAQ5<sup>BAJO</sup>. Nuestros datos revelaron que las células CD71+/Ter119+ doble positivas nucleadas en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* presentan una pérdida parcial de CD98 (Figura 21), probablemente - en línea con el comentario anterior - porque la anemia induzca otros transportadores de aminoácidos en las células CD71+/Ter119+ que puedan asociarse a CD98 diferentes a LAT1 (ver discusión). Sin embargo, las células CD71+/Ter119+ doble positivas, identificadas como reticulocitos, presentaban una pérdida más marcada de la señal para CD98 en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*



(Figura 21). Este hecho podría indicar que el heterodímero LAT1/CD98 es preponderante frente a otros posibles heterodímeros de CD98 en reticulocitos CD71+/Ter119+ presentes en el bazo.

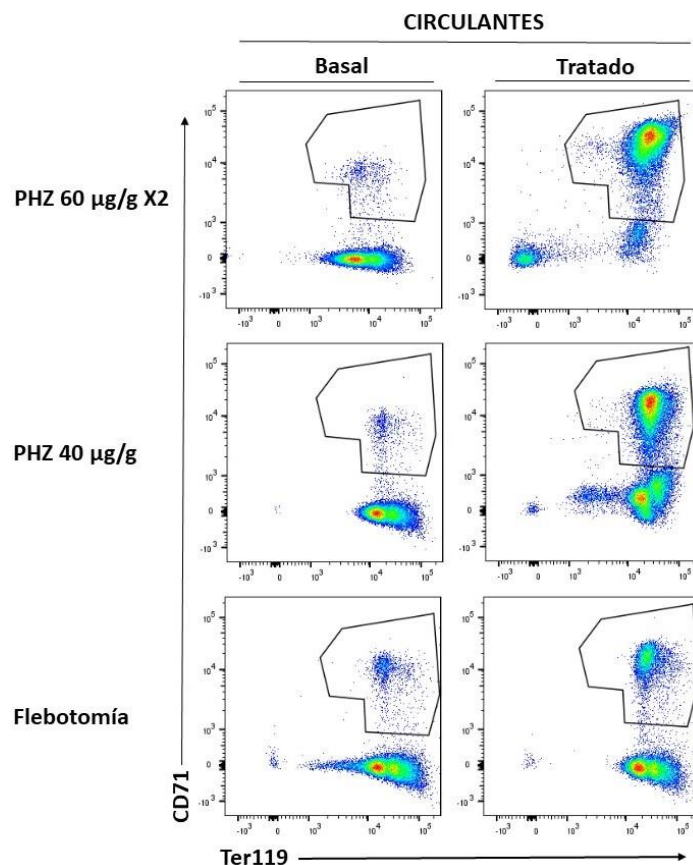


**Figura 21. Expresión de CD98 (LAT1/CD98) en células CD71+/Ter119+ doble positivas DRAQ5<sup>ALTO</sup> y CD71+/Ter119+ doble positivas DRAQ5<sup>BAJO</sup> en el bazo de animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* y animales control tratados con PHZ. Diagramas de puntos de expresión de DRAQ5 frente al tamaño (FSC) de la población CD71+/Ter119+ diferenciando dos poblaciones por expresión de ácidos nucleicos y tamaño (FSC). Histogramas de expresión de CD98 (representado en moda) de la población CD71+/Ter119+ DRAQ5<sup>ALTO</sup> y CD71+/Ter119+ DRAQ5<sup>BAJO</sup> en animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (verde) y animales control (rojo) tratados con PHZ (1 dosis de 40 µg/g). El control sin marcar se indica en negro. Experimento representativo de 3 realizados.**

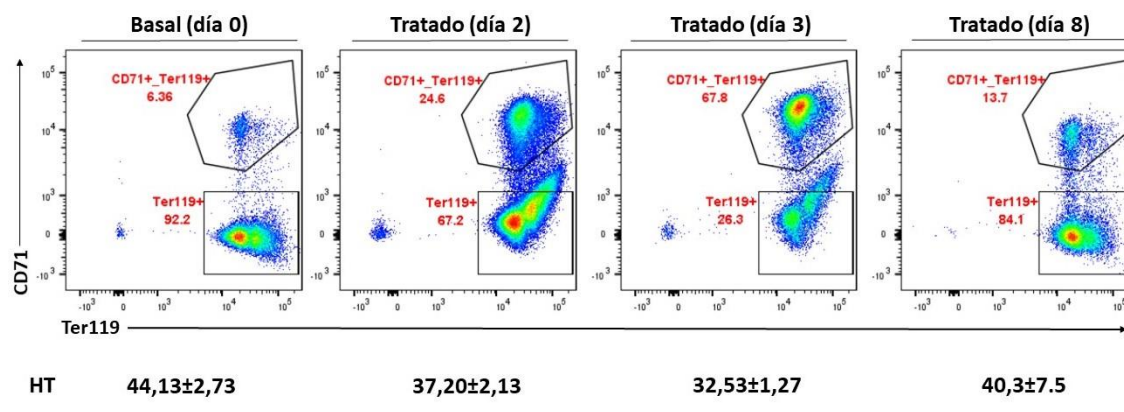
### 3. Expresión de LAT1/CD98 en progenitores eritroides circulantes en condiciones de estrés eritropoyético.

Además del análisis de los precursores eritroides en el bazo, realizamos un análisis por citometría de flujo de células circulantes a día 3 en cada uno de los modelos de anemia. Observamos un aumento muy marcado de precursores eritroides CD71+/Ter119+ doble positivos circulantes tras el tratamiento con PHZ (Figura 22). Este aumento de precursores eritroides también se aprecia con claridad tras inducir anemia con el modelo de flebotomía descrito anteriormente (Figura 22). Además, estos precursores circulantes, que pueden apreciarse a 2-3 días disminuyen casi al

nivel basal al cabo de 8 días como se muestra en el modelo de 40  $\mu\text{g/g}$  de PHZ (Figura 23).



**Figura 22.** Expansión de población CD71+/Ter119+ en células circulantes de animales control no tratados y tratados con PHZ o flebotomía. Diagrama de puntos de expresión de CD71 y Ter119 en células circulantes de ratón discriminando las poblaciones CD71+/Ter119+ (población incluida dentro del recuadro superior derecha) y CD71-/Ter119+ en condiciones basales y tras tratamiento con PHZ (2 dosis de 60  $\mu\text{g/g}$  o 1 de 40  $\mu\text{g/g}$ ) o flebotomía. Experimento representativo de 23 realizados.

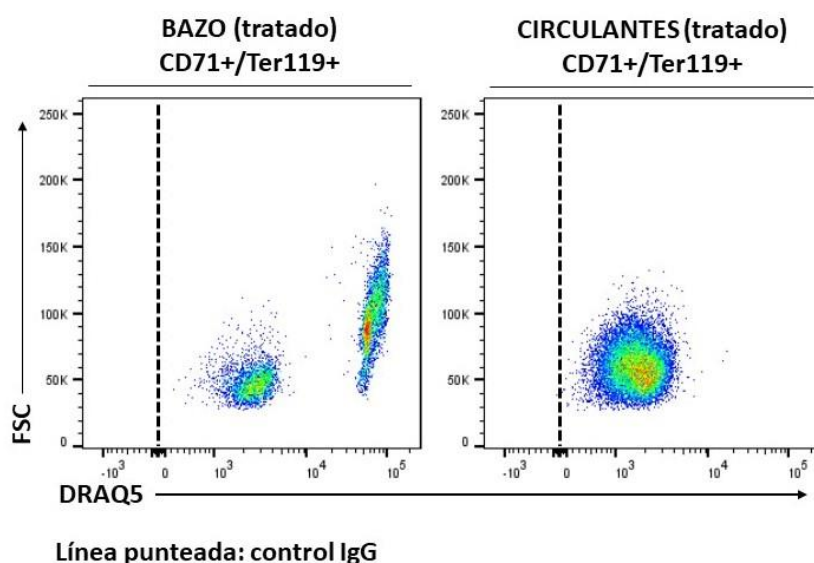


**Figura 23.** Cinética de aparición de eritroblastos CD71+/Ter119+ circulantes tras tratamiento con PHZ (40  $\mu\text{g/g}$ ). Diagramas de puntos representativos de expresión de CD71 y Ter119 en células



circulantes de animal en basal (día 0) y tras tratamiento con PHZ (40  $\mu\text{g/g}$ ) a día 2, 3 y 8. Debajo se muestra el valor de hematocrito (HT) medio cada día en este grupo de experimentos.

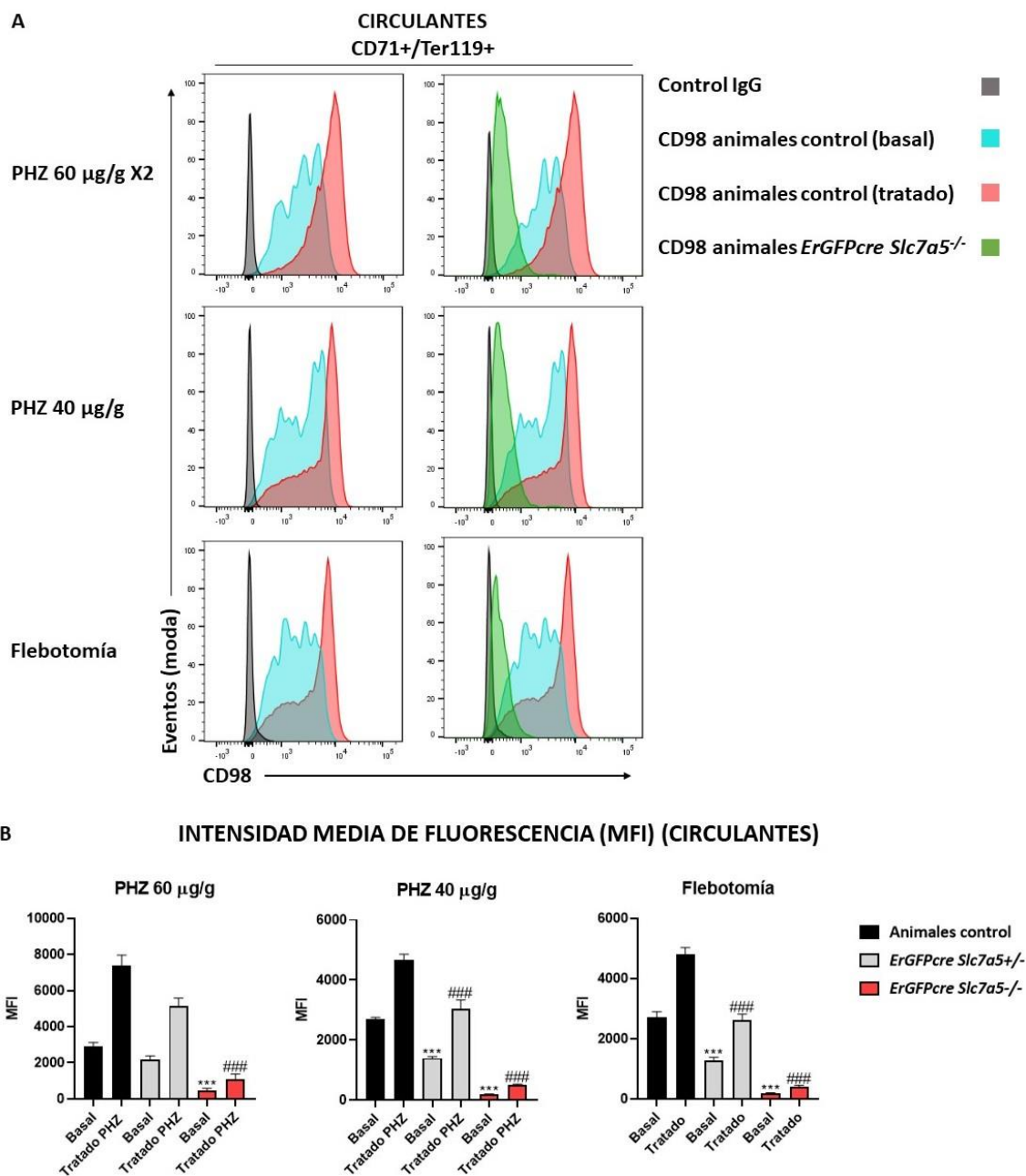
En principio estas células CD71+/Ter119+ circulantes deberían ser reticulocitos ya que son los únicos precursores eritroides que pueden detectarse en periferia (Moras et al., 2017; Palis, 2014) pero quisimos confirmar este punto. Para ello comparamos la señal de ADN/ARN mediante DRAQ5 y su tamaño mediante el análisis de FSC (como en la Figura 21) en las células doble positivas (CD71+/Ter119+) comparando las que se expanden en el bazo y las que aparecen en periferia (Figura 24).



**Figura 24. Señal de ácidos nucleicos (DRAQ5) y tamaño (FSC) en células CD71+/Ter119+ de bazo y células circulantes de animales tratados con PHZ (40  $\mu\text{g/g}$ ).** Diagrama de puntos de tamaño celular (FSC) frente a DRAQ5 (presencia de ácidos nucleicos) comparando células CD71+/Ter119+ en bazo y células circulantes de animales tratados con PHZ (40  $\mu\text{g/g}$ ). La línea punteada representa el área donde se encuentra el control IgG-APC. Experimento representativo de 3 realizados.

Tal y como comprobamos en la Figura 24 las células CD71+/Ter119+ presentes en el bazo están compuestas por eritroblastos nucleados DRAQ5<sup>ALTO</sup> con una señal FSC de rango variable, y reticulocitos DRAQ5<sup>BAJO</sup> de un FSC menor. Sin embargo, las células doble positivas (CD71+/Ter119+) circulantes presentaban únicamente DRAQ5<sup>BAJO</sup> y un FSC<sup>BAJO</sup> (Figura 24). Por lo tanto, estos datos indican que únicamente los reticulocitos CD71+/Ter119+ doble positivos originados en gran medida en el bazo - pero no las CD71+/Ter119+ doble positivas nucleadas - son efectivamente los que terminan alcanzando la sangre periférica en condiciones de estrés eritropoyético tras la

inducción de la anemia. Por supuesto, también evaluamos la expresión de LAT1/CD98 en estas células precursoras CD71+/Ter119+ circulantes.



**Figura 25. Expresión de CD98 (LAT1/CD98) en células CD71+/Ter119+ doble positivas en células circulantes de animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* y animales control.** (A) Histogramas de expresión de CD98 (representado en moda) en la población CD71+/Ter119+ en ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (verde) ratones control basal (azul) o tratados con PHZ (rojo). Control IgG-APC (negro). Experimento representativo de 17 realizados. (B) Intensidad media de fluorescencia de CD98 en reticulocitos CD71+/Ter119+ circulantes en condiciones basales o de anemia (PHZ 60 y 40 µg/g y flebotomía) en animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (PHZ 60 µg/g n=basal:2; tratados:2; PHZ 40 µg/g n=basal:16; tratados:14; Flebotomía n=basal:3; tratados:3), *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* (PHZ 60 µg/g n=basal:2; tratados:2; PHZ 40 µg/g n=basal:11; tratados:10; Flebotomía n=basal:4; tratados:4) y animales control (PHZ 60 µg/g n=basal:13; tratados:11; PHZ 40 µg/g n=basal:33; tratados:20; Flebotomía n=basal:8; tratados:8). Los datos se muestran como media ± SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo usando t de student seguido

de corrección de Welch \*  $p < 0.05$ . Se indica si es significativo con animales control con (\*) frente a basales y (#) frente a tratados.

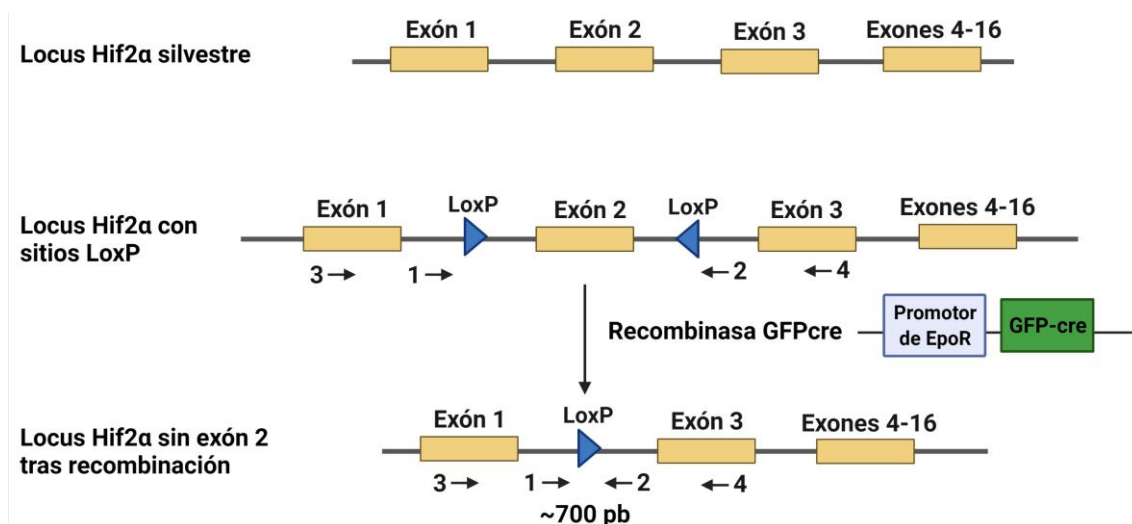
En primer lugar, encontramos que estas células CD71+/Ter119+ circulantes también inducían - como en el caso del bazo - la señal en superficie de CD98 en los tres modelos de anemia utilizados (Figura 25). Además, observamos que - al igual que los reticulocitos CD71+/Ter119+ doble positivos presentes en el bazo (Figura 21) - la mayoría de la señal obtenida con el anti-CD98 en estas células circulantes se perdía en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*. Además, como control adicional, observamos una pérdida intermedia de la señal de CD98 en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* heterocigotos. Por lo tanto, estos datos demuestran que LAT1 es la subunidad preferente de asociación con CD98 tanto en los reticulocitos del bazo como en los que alcanzan la sangre periférica y que su expresión en superficie se induce en condiciones de anemia (Figura 25).

#### 4. HIF2 $\alpha$ no controla la inducción de LAT1 en el linaje eritroide.

Como ya hemos introducido y mostrado previamente, *SLC7A5* (LAT1) se induce en respuesta a la activación del factor de respuesta a hipoxia HIF2 $\alpha$  en carcinoma renal donde facilita la proliferación autónoma de célula y por lo tanto la progresión de este tipo de tumores (Elorza et al. 2012). Además, *Slc7a5* se induce en diversos tejidos como pulmón, hígado o riñón mediante HIF2 $\alpha$  (Figura anterior 8-10) (Elorza et al. 2012) y en el caso del pulmón se ha asociado a la proliferación de la células Club del epitelio pulmonar (Torres-Capelli et al., 2016). En este sentido, nos preguntamos si la expresión del heterodímero LAT1/CD98 en precursores eritroides en condiciones de estrés eritropoyético estaba también controlada por HIF2 $\alpha$ . En esta línea, hipotetizamos que la situación de anemia podría generar una hipoxia local en el bazo que potencialmente pudiera activar HIF2 $\alpha$  en los propios precursores eritroides con el fin de inducir *Slc7a5* y promover así su expansión. Para este propósito inactivamos HIF2 $\alpha$  en el linaje eritroide utilizando ratones en los que el exón 2 de HIF2 $\alpha$  está flanqueado por dos sitios LoxP cruzados - como el caso de los ratones *Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* - con ratones *ErGFPcre* para la inactivación de HIF2 $\alpha$  específica en el linaje eritroide. Estos ratones los denominamos *ErGFPcre Hif2 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* (Figura 26).

Para comprobar la inactivación del locus de *Hif2 $\alpha$*  analizamos el ADN genómico de bazos de ratones *ErGFPcre Hif2 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* y ratones control (Figura 27A). Para este

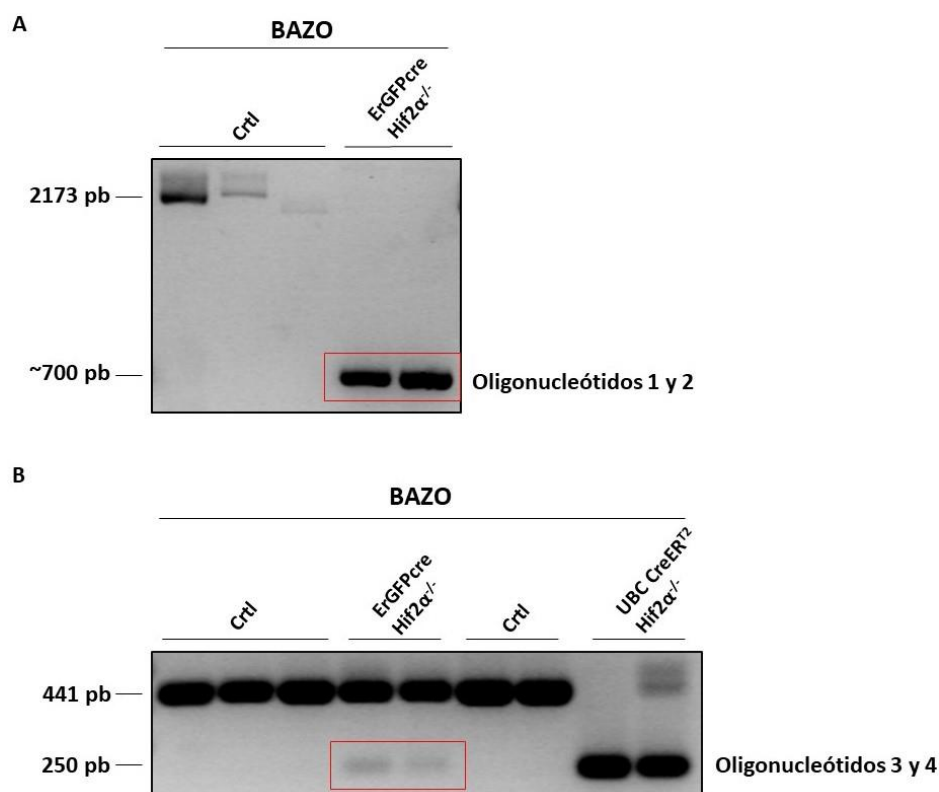
análisis empleamos los oligonucleótidos 1 y 2 incluidos en la Figura 26. Estos oligonucleótidos amplificaban una banda de ~700 pb únicamente en los bazos de los ratones *ErGFPcre Hif2a<sup>LoxP/LoxP</sup>* que era indicativa de la delección del exón 2 del locus de *Hif2a* incluido entre los sitios LoxP (Figura 27A).



**Figura 26. Generación de ratones *ErGFPcre Hif2a<sup>LoxP/LoxP</sup>* para inactivación de *Hif2a* en el linaje eritroide.** Representación del locus murino de *Hif2a* en su forma silvestre (esquema superior), con los sitios LoxP insertados (esquema intermedio) y tras la recombinação (esquema inferior) mediada por la acción de la recombinasa cre cuya expresión está controlada por el promotor del receptor de Epo (*EpoR*). Se representan las posiciones donde hibridan los oligonucleótidos 1 y 2 que permiten detectar la delección del exón 2 por la aparición de un amplicón de ~700 pares de bases. Se representan las posiciones donde hibridan los oligonucleótidos 3 y 4 que permiten detectar la delección del exón 2 en el transcrito de ARN.

Posteriormente analizamos si esta escisión promovía la desaparición del ARNm de *Hif2a* y la aparición de un transcrito de *Hif2a* truncado sin exón 2 donde exón 1 y exón 3 quedan contiguos. Para ello, se analizó la expresión relativa de estos transcritos empleando un oligonucleótido 5' en el exón 1 (oligonucleótido 3) y otro 3' en el exón 3 (oligonucleótido 4) (Figura 26). En los ratones control aparecía únicamente una banda de 441 pb correspondiente al ARNm silvestre de *Hif2a* (Figura 27B). Sin embargo, en los ratones *ErGFPcre Hif2a<sup>LoxP/LoxP</sup>* aparecería la banda de genotipo silvestre (correspondiente a la expresión de HIF2α en células que no son del linaje eritroide) y una banda más tenue de 250 pb correspondiente al transcrito de ARNm de *Hif2a* truncado (correspondiente a un ARNm de *Hif2a* que ha perdido el exón 2 en el linaje eritroide) (Figura 27B). La señal de *Hif2a* truncado en los ratones *ErGFPcre Hif2a<sup>LoxP/LoxP</sup>* es modesta lo que podría indicar que *Hif2a* se expresa de manera limitada en el linaje eritroide y más abundantemente en otros tipos celulares presentes en el bazo. En este sentido un análisis similar utilizando otra línea de ratón *UBC-cre-ER<sup>T2</sup> Hif2a<sup>LoxP/LoxP</sup>* - que expresan la recombinasa cre de forma ubicua en todos los

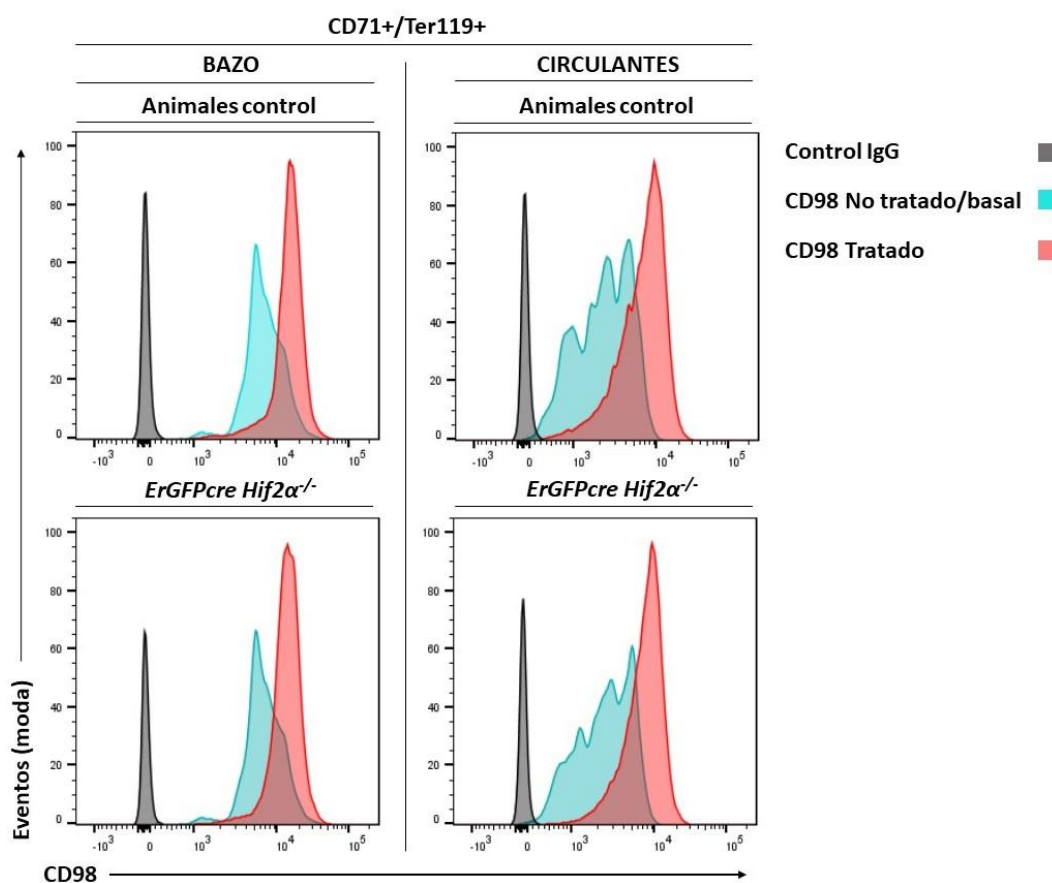
tipos celulares - desveló que prácticamente la totalidad del ARNm de *Hif2α* detectado en el bazo era en la forma truncada (Figura 27B) lo que confirmaba que *HIF2α* se expresa en otros tipos celulares no pertenecientes al linaje eritroide y quizá incluso de manera más abundante.



**Figura 27. Comprobación de la delección del locus de *Hif2α* y generación de un ARNm de *Hif2α* truncado en linaje eritroide en animales *ErGFPcre Hif2α<sup>LoxP/LoxP</sup>*. (A) PCR convencional con los oligonucleótidos 1 y 2 (Figura 26) utilizando ADN genómico extraído del bazo de animales control y *ErGFPcre Hif2α<sup>LoxP/LoxP</sup>* (recuadro rojo). (B) PCR sobre ADNc con los oligonucleótidos 3 y 4 (Figura 26) obtenido a partir de ARN de bazo de animales control y *ErGFPcre Hif2α<sup>LoxP/LoxP</sup>* (delección en recuadro rojo) y *UBC-cre-ER72 Hif2α*.**

Finalmente evaluamos por citometría de flujo la expresión de CD98 en superficie en células CD71+/Ter119+ doble positivas tanto en ratones *ErGFPcre Hif2α<sup>LoxP/LoxP</sup>* como en ratones control en condiciones de anemia. Nuestros resultados muestran que la expresión de CD98 en células CD71+/Ter119+ doble positivas - tanto en bazo como en sangre periférica - no se reduce en ratones *ErGFPcre Hif2α<sup>LoxP/LoxP</sup>* cuando se compara con ratones control (Figura 28). Cabe destacar que la ausencia de HIF2α no parece afectar la expresión de CD98 no solo en condiciones de anemia sino tampoco en condiciones basales (Figura 28). Por lo tanto, a diferencia de otros escenarios biológicos - como en carcinoma renal - HIF2α no parece controlar la inducción de

*Slc7a5* en precursores eritroides quizá por su modesta expresión en el linaje eritroide probablemente anticipando la participación de otros factores de transcripción que controlan la expresión de *Slc7a5* (ver discusión).



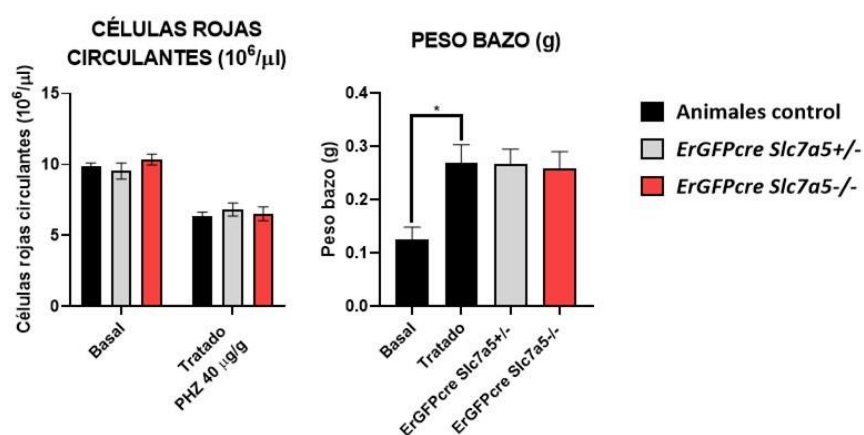
**Figura 28.** Expresión de CD98 (LAT1/CD98) en células CD71+/Ter119+ doble positivas en el bazo y circulantes (reticulocitos) en animales *ErGFPcre Hif2α<sup>LoxP/LoxP</sup>* y animales control. Histogramas de expresión de CD98 (representado en moda) en la población CD71+/Ter119+ (reticulocitos) en bazo y en circulación en animales *ErGFPcre Hif2α<sup>LoxP/LoxP</sup>* y animales control en basal (azul) o tratados con PHZ (2 dosis 60 µg/g) (rojo). Control IgG-APC (negro). Experimento representativo de 5 realizados.

### 5. La ausencia de LAT1 en el linaje eritroide promueve un escenario de hiper-eritropoyetinia.

El patrón de expresión de LAT1/CD98 en el linaje eritroide y su inducción en condiciones de anemia nos permitió hipotetizar su posible papel en la proliferación de los precursores eritroides, así como en el control del hematocrito y por lo tanto en la oxigenación tisular. Debido a que LAT1/CD98 se expresa en condiciones basales en los precursores eritroides prestamos especial atención al fenotipo de los ratones no solo sometidos a anemia (PHZ 40 µg/g) sino también en condiciones basales. En primer lugar, constatamos que el número total de células rojas en circulación en



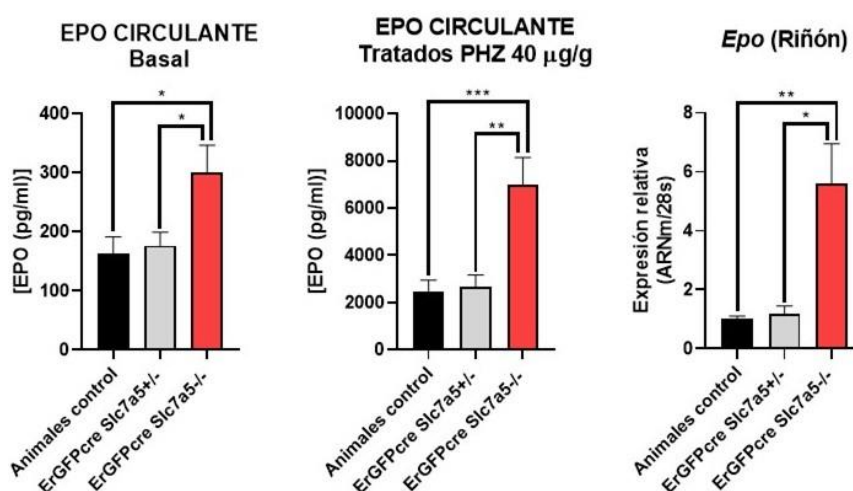
sangre periférica en condiciones basales era similar en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* cuando se comparaba con los ratones control (Figura 29), aspecto que podría resultar algo sorprendente teniendo en cuenta el papel de LAT1/CD98 en la proliferación de diversas células tumorales. En condiciones de anemia el número total de células rojas en circulación disminuía debido a la eliminación masiva de eritrocitos maduros por PHZ. Esta disminución era similar tanto en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* como en los ratones control y heterocigotos *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* (Figura 29). Además, la esplenomegalia que acontece tras un estrés eritropoyético también era similar en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* como en los ratones control (Figura 29).



**Figura 29. Análisis del número total de células rojas, porcentaje de reticulocitos circulantes y peso del bazo en animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*, *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* y animales control.** Análisis de células rojas totales en circulación y peso de bazo (g, gramos) en animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (n=basal:25; tratados:15), *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* (n=basal:15; tratados:7) y animales control (n=basal:49; tratados:11) en basal o tras tratamiento con PHZ (40 μg/g). Los datos se muestran como media ± SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo usando t de student seguido de corrección de Welch \* p < 0.05.

Estos datos nos llevaron a concluir que la expansión de los precursores eritroides no se veía comprometida por la pérdida de LAT1 en el linaje eritroide y que por lo tanto la oxigenación de los tejidos podría ser normal en los animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*. Sin embargo, quisimos evaluar este aspecto más en profundidad. Un parámetro que es reflejo de la oxigenación de los tejidos es la EPO circulante ya que el riñón eleva los niveles de EPO circulante cuando el aporte de oxígeno en los tejidos es insuficiente. Aunque el número total de células rojas en circulación no se veía alterado, observamos que los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* tenían unos niveles de EPO circulante en el suero más elevados que los ratones control - incluidos los ratones heterocigotos *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* - tanto en condiciones de anemia como en

condiciones basales (Figura 30). En línea con estos datos, observamos una mayor elevación del ARNm de *Epo* en el riñón de los animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* en condiciones de anemia sugiriendo que el aumento de EPO circulante era una consecuencia de una mayor inducción transcripcional de la expresión renal de *Epo* (Figura 30). Por lo tanto, este exceso de EPO circulante (hiper-eritropoyetinemias) podría considerarse un signo de que los tejidos periféricos (como el riñón como órgano central de la detección de la PO<sub>2</sub> arterial) no reciben un aporte óptimo de oxígeno lo que desencadena ese aumento de producción de EPO en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*.



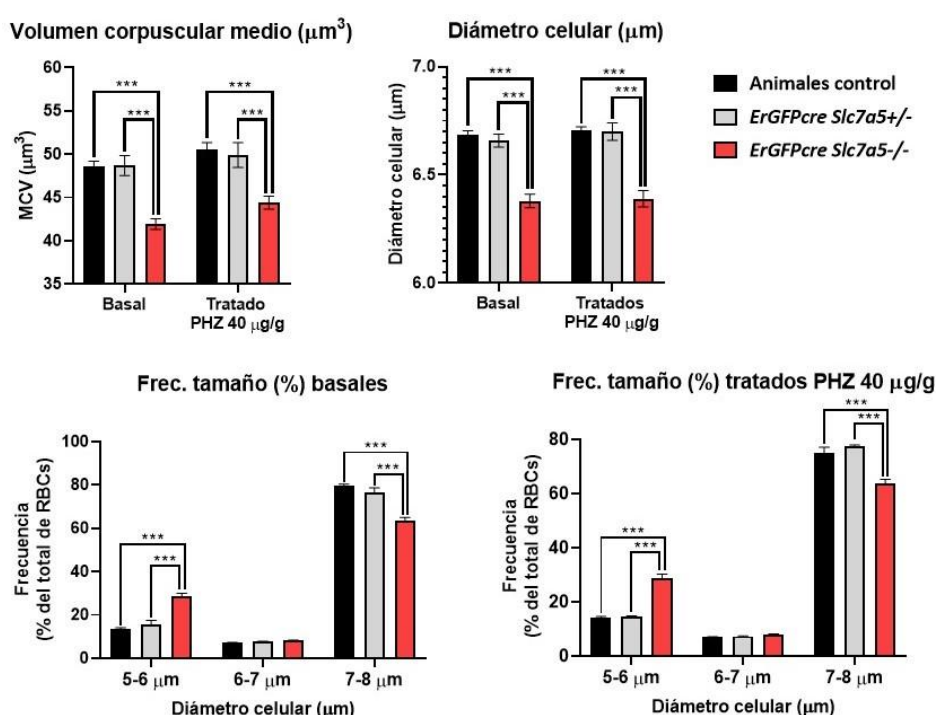
**Figura 30. Expresión de EPO circulante y expresión renal del ARNm de *Epo* en animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*, *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* y animales control.** Expresión de proteína de EPO circulante (pg/ml) y de ARNm de *Epo* en riñón relativo a 28s en animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (n=basal:13; tratados:16), *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* (n=basal:4; tratados:9) y animales control (n=basal:18; tratados:18) en basal y tras tratamiento con PHZ (40 µg/g). Los datos se muestran como media ± SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo usando t de student seguido de corrección de Welch \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 y \*\*\* p < 0.001.

## 6. La deficiencia de LAT1 en el linaje eritroide disminuye el tamaño de las células rojas circulantes.

A continuación, consideramos si - aun habiendo el mismo número total de células rojas circulantes en los ratones deficientes para *Slc7a5* - las células rojas circulantes de los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* presentaban algún defecto que comprometiese su capacidad para transportar oxígeno que pudiera explicar la elevada respuesta compensatoria en forma de EPO circulante. En este sentido pudimos constatar que el volumen corpuscular medio (MCV) de las células rojas circulantes era significativamente menor en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (Figura 31). También



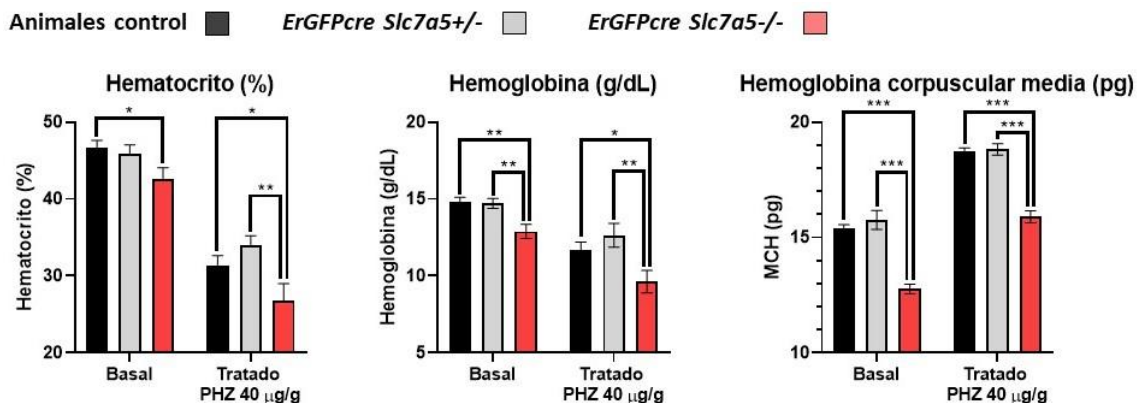
analizamos directamente su diámetro, empleando un contador automatizado de células que confirmó que el diámetro medio de las células rojas circulantes se reduce en ausencia de LAT1 en el linaje eritroide (Figura 31). Además, este análisis permitió establecer que el porcentaje de eritrocitos con un menor diámetro (5-6  $\mu\text{m}$ ) aumentaba en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* mientras que aquellos de un mayor tamaño (7-8  $\mu\text{m}$ ) disminuían en estos ratones (Figura 31). Destacar que esta disminución de tamaño era aparente tanto en condiciones basales, así como tras la inducción de la anemia (Figura 31). En este sentido debe recordarse que la expresión de LAT1/CD98 se detecta en el linaje eritroide tanto en condiciones basales como de anemia (Figuras 12, 17-18, 25).



**Figura 31. Análisis del volumen corpuscular medio y del diámetro de las células circulantes en animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*, *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* y animales control.** Volumen corpuscular medio (MCV,  $\mu\text{m}^3$ ) y tamaño celular midiendo el diámetro ( $\mu\text{m}$ ) y las frecuencias de tamaño (%) en animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (n=basal:25; tratados:15), *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* (n=basal:15; tratados:7) y animales control (n=basal:49; tratados:11) en condiciones basales o tras tratamiento con PHZ (40  $\mu\text{g/g}$ ). Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo usando t de student seguido de corrección de Welch \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

En línea con una no afectación del número de células circulantes, pero si de una disminución de su tamaño pudimos constatar que el hematocrito de los ratones era significativamente menor en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (Figura 32).

Además, tanto la hemoglobina circulante como la hemoglobina corpuscular media (MCH) se encontraba reducida en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (Figura 32).



**Figura 32. Análisis del hematocrito, hemoglobina y hemoglobina corpuscular media en animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*, *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* y animales control.** Medida de hematocrito (%), hemoglobina (g/dL) y hemoglobina corpuscular media (MCH, pg) en animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* (n=basal:25; tratados:15), *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/+</sup>* (n=basal:15; tratados:7) y animales control (n=basal:49; tratados:11) en basal o tras tratamiento con PHZ (40 µg/g). Los datos se muestran como media ± SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo usando t de student seguido de corrección de Welch \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 y \*\*\* p < 0.001.

Por lo tanto, estos datos nos llevaron a sugerir que la deficiencia de LAT1 en el linaje eritroide no altera el número total de células rojas circulantes, pero si específicamente el tamaño y cantidad de hemoglobina, lo cual genera una elevación en los niveles de EPO circulantes (hiper-eritropoyetinemia) probablemente como consecuencia de una oxigenación tisular crónicamente reducida.

# DISCUSIÓN

# DISCUSIÓN

## PARTE I

Las isoformas de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  son factores centrales en la respuesta celular a la hipoxia. Sin embargo, algunos genes dependientes de HIF presentan preferencia por la isoforma HIF1 $\alpha$  y otros por la isoforma HIF2 $\alpha$ . Este fenómeno se ha estudiado en gran medida en células ccRCC deficientes en *Vhl* caracterizadas por la activación constitutiva de las isoformas de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ , donde cada isoforma tiene un efecto biológico diferente. Efectivamente, algunos genes como *CAIX* se encuentran preferentemente inducidos por HIF1 $\alpha$  en células ccRCC, mientras que otros genes como *PHD3* se inducen preferentemente por HIF2 $\alpha$  (Cho et al., 2016; Hu et al., 2003; Hu et al., 2007; Lau et al., 2007; Persson et al., 2020; Raval et al., 2005). En este estudio evaluamos la contribución de los dominios N-terminal y C-terminal de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  para conferir su especificidad en un grupo relativamente amplio de genes en un modelo de ccRCC (células WT8). Además, evaluamos si esta especificidad se mantenía *in vivo* en ratones deficientes en *Vhl* que presentan una actividad constitutiva de ambas isoformas.

Con respecto a la especificidad de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en diferentes escenarios biológicos, algunos de los genes preferentemente regulados por HIF2 $\alpha$  como *SLC7A5*, *PHD3*, *TGFA* y *NDRG1* muestran esta preferencia por la isoforma HIF2 $\alpha$  tanto *in vivo* en animales deficientes para *Vhl* como *in vitro* en la línea celular WT8. Sin embargo, mientras *Slc7a5* y *Phd3* se inducen en los tres tejidos analizados (hígado, riñón y pulmón) de los ratones deficientes en *Vhl*, *NdrG1* solo se induce en hígado y pulmón y *Tgfa* únicamente en el pulmón. A este respecto, no podemos descartar que la expresión de *Tgfa* y *NdrG1* pueda estar inducida en algún tipo celular concreto en los tejidos donde no detectamos inducción en los animales *Vhl*<sup>-/-</sup> y no podamos detectarlo por el análisis de ARN del tejido completo. En esta línea, se ha documentado una mayor expresión de *Tgfa* en modelos tumorales murinos deficientes en *Vhl* en células epiteliales de riñón (Hoefflin et al., 2020). Este modelo tumoral presenta un escenario biológico diferente al empleado en nuestros estudios, ya que debemos considerar que estos tumores están caracterizados por un microambiente específico y que la sola inactivación del gen de *Vhl* (como en nuestro modelo) no es suficiente para iniciar la generación de un carcinoma renal (Guinot et al., 2016; Harlander et al., 2017; Iliopoulos et al., 1995), lo que podría explicar las diferencias entre los dos modelos en cuanto a la expresión de *Tgfa*. Otros genes dependientes de HIF muestran una especificidad diferente por HIF1 $\alpha$  o HIF2 $\alpha$  en ratones comparado con células humanas WT8. Por ejemplo, la expresión de *GLUT1* está controlada preferentemente por HIF2 $\alpha$  en células WT8, mientras que *PGM1* está preferentemente inducido por la isoforma

HIF1 $\alpha$ . Sin embargo, nuestros datos presentan que el aumento de expresión de *Glut1* y *Pgm1* en los tejidos de ratones deficientes en *Vhl* analizados, no se reduce significativamente al inactivar de manera individual HIF1 $\alpha$  o HIF2 $\alpha$ , lo que podría sugerir que ambas isoformas son responsables de la inducción de *Glut1* y *Pgm1* en los tejidos analizados. En línea con esto, se ha observado que la expresión de *GLUT1* está controlada por HIF1 $\alpha$  en células Hep3B (Hu et al., 2007; Pawlus et al., 2013), lo que contrasta con células de carcinoma de renal en la que está preferentemente inducido por HIF2 $\alpha$ . Estas diferencias de especificidad de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en función del modelo biológico se han observado recientemente en el caso de *SLC7A5*. En este sentido, como ya se ha mostrado y mencionado previamente *SLC7A5* está inducido preferentemente por HIF2 $\alpha$  en células RCC deficientes en *VHL* así como en tejido hepático y pulmonar de ratones deficientes en *Vhl* (Bouthelier & Aragonés, 2020; Elorza et al., 2012). Además, HIF2 $\alpha$  controla la expresión de *SLC7A5* en otros contextos biológicos como en células de neuroblastoma (Corbet et al., 2014; Onishi et al., 2019). Sin embargo, en células de glioblastoma se ha observado recientemente una inducción de *SLC7A5* en respuesta a hipoxia, no solo mediada por HIF2 $\alpha$  sino también por la isoforma HIF1 $\alpha$  (Zhang et al., 2020). La base molecular que subyace a la selectividad de las isoformas de HIF en función del tipo celular es todavía desconocida. Datos previos, así como nuestros propios datos, sugieren que factores específicos de cada tejido, o línea celular, pueden influir en la participación de HIF1 $\alpha$  o HIF2 $\alpha$  en la regulación de algunos genes dependientes de HIF. Del mismo modo, la abundancia relativa de las isoformas de HIF1 $\alpha$  o HIF2 $\alpha$  en cada tipo celular, puede contribuir, en cierta medida, a la selectividad de los factores HIF, especialmente teniendo en cuenta el patrón de expresión específico de HIF1 $\alpha$  o HIF2 $\alpha$  en los tejidos (Tian et al., 1997; Wiesener et al., 2003). Tampoco podemos descartar que existan diferencias en la selectividad de los factores HIF entre humano y ratón en ciertos genes dependientes de HIF.

Con respecto a las regiones específicas de HIF1 $\alpha$  o HIF2 $\alpha$  que controlan dicha especificidad, estudios previos muestran que la especificidad de HIF1 $\alpha$  por genes como *CAIX* o *PGK1* no se puede explicar simplemente por la unión preferente de HIF1 $\alpha$  al HRE localizada en las regiones reguladoras de estos genes (Hu et al., 2007; Lau et al., 2007). De hecho, HIF2 $\alpha$  es capaz de unirse al HRE de estos dos genes en células sometidas a hipoxia o en células RCC deficientes en *Vhl* sin ser capaz de promover su inducción (Hu et al., 2007; Lau et al., 2007). En estudios similares, se observó que una proteína quimérica de HIF que contiene el dominio bHLH-PAS de HIF1 $\alpha$  fusionado a la región NTAD/CTAD de HIF2 $\alpha$  no es capaz de inducir la

expresión de los genes *CAIX* y *PGK1* en células HEK293 o células RCC (Hu et al., 2007; Lau et al., 2007; Pawlus et al., 2013), evidenciando la relevancia de la región NTAD/CTAD de HIF1 $\alpha$  en la especificidad por sus genes diana. En línea con estos datos, mostramos que una construcción similar (HIF (P-A)<sup>2</sup> (N1/C2)) no es capaz de inducir la expresión de *CAIX*, pero tampoco, de otros genes dependientes de HIF1 $\alpha$  como *BNIP3* o *PGM1*. Además, la región NTAD parece ser esencial para explicar la selectividad de HIF1 $\alpha$  por sus genes diana (Hu et al., 2007; Lau et al., 2007; Pawlus et al., 2013). En este sentido, una proteína quimérica de HIF que contiene el dominio bHLH-PAS de HIF2 $\alpha$  y la región NTAD/CTAD de HIF1 $\alpha$  es suficiente para inducir la transcripción del gen *PGK1* en células HEK293 (Hu et al., 2007). Estos datos sugieren que la especificidad de HIF1 $\alpha$  por *PGK1* se puede atribuir, en cierta medida, a su región NTAD. Sin embargo, nuestros datos muestran que la quimera de HIF que contiene el dominio bHLH-PAS de HIF2 $\alpha$  y la región NTAD/CTAD de HIF1 $\alpha$  no es capaz de inducir la expresión de *CAIX*, *BNIP3* y *PGM1* en células WT8. En línea con nuestros datos, dos estudios independientes han encontrado datos similares en cuanto a la expresión de *CAIX* en células 786-O y HEK293 (Lau et al., 2007; Pawlus et al., 2013). Estos datos indican que tanto la región bHLH-PAS como la región NTAD/CTAD son relevantes para la selectividad de HIF1 $\alpha$  por ciertos genes diana como *CAIX*, *BNIP3* y *PGM1*. En cuanto a la relevancia de la región bHLH-PAS, las isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  muestran patrones diferentes de unión al ADN para ciertos genes (Schödel et al., 2013; Smythies et al., 2019) y, por lo tanto, algunos genes, pero no todos, dependientes de HIF1 $\alpha$  como *BNIP3* y *PGM1* quizás no permitan la unión de HIF2 $\alpha$  a sus respectivos promotores. De hecho, la unión de HIF1 $\alpha$  al ADN está asociada con modificaciones de histonas H3K4me3, mientras que la unión de HIF2 $\alpha$  está asociada con modificaciones H3K4me1 (Smythies et al., 2019). En cuanto a otros factores que pueden ayudar a HIF1 $\alpha$  en la transcripción de sus genes diana se ha propuesto al factor de transcripción STAT3, el cual puede ser reclutado específicamente en los promotores de genes dependientes de HIF1 $\alpha$  como *CAIX*, donde contribuye ampliamente en la expresión del gen mediada por HIF1 $\alpha$  (Pawlus et al., 2014; Pawlus et al., 2013). De la misma manera es posible que STAT3 pueda también participar en la inducción de otros genes dependientes de HIF1 $\alpha$ , como *BNIP3* y *PGM1*.

Con respecto a los genes preferentemente regulados por la isoforma HIF2 $\alpha$ , estudios previos han mostrado que la quimera de HIF que incluye el dominio bHLH-PAS de HIF1 $\alpha$  y la región NTAD/CTAD de HIF2 $\alpha$  es capaz de inducir genes dependientes de HIF2 $\alpha$  como *PHD3*, *PAI-1* o adrenomedulina (*ADM*) (Hu et al., 2007; Lau et al., 2007;

Pawlus et al., 2013). Nosotros extendimos este análisis en células WT8 a otros genes dependientes de HIF2 $\alpha$  como *PHD3*, *OCT-4*, *NDRG1*, *TGFA*, *GLUT1*, *CCND1* y *SLC7A5*. Primero encontramos que la expresión de estos genes dependientes de HIF2 $\alpha$  no se induce o se afecta mínimamente por la construcción quimérica que contiene la mitad bHLH-PAS de HIF2 $\alpha$  y la mitad NTAD/CTAD de HIF1 $\alpha$ . Por el contrario, la quimera de HIF que presenta la mitad bHLH-PAS de HIF1 $\alpha$  y la mitad NTAD/CTAD de HIF2 $\alpha$  es suficiente para inducir, en distinta medida, los genes diana dependientes de HIF2 $\alpha$  analizados (Figura 6) (Boutheilier et al., 2020). En este sentido, cabe señalar, que la quimera de HIF que contiene la mitad bHLH-PAS de HIF1 $\alpha$  y la mitad NTAD/CTAD de HIF2 $\alpha$  (HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2)) induce parcialmente la expresión de la mayoría de los genes dependientes de HIF2 $\alpha$  analizados, excepto de *PHD3* que presenta niveles de inducción mayores con la quimera que con la forma silvestre HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>. Por otro lado, la inducción con esta quimera (HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2)) es parcial - pero se observa de manera clara - para los genes *TGFA*, *GLUT1*, *CCND1* y *SLC7A5*. Sin embargo, debemos considerar que algunos otros genes dependientes de HIF2 $\alpha$  analizados como *OCT-4* y *NDRG1* se inducen en menor medida, por esta quimera, que otros genes dependientes de HIF2 $\alpha$ . Estos datos sugieren que la mitad NTAD/CTAD de HIF2 $\alpha$  no es suficiente para alcanzar la actividad total de HIF2 $\alpha$  para ciertos genes dependientes de HIF2 $\alpha$ . Sin embargo, como se indica en la Figura 5 la construcción HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) se expresa constantemente en menor medida que la forma silvestre HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, lo que podría explicar la inducción parcial de genes dependientes de HIF2 $\alpha$  por la quimera HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2). No obstante, no podemos descartar que la inducción total de la respuesta de HIF2 $\alpha$  requiera la presencia de las dos mitades bHLH-PAS y NTAD/CTAD para algunos - no todos - los genes dependientes de HIF2 $\alpha$ .

En cuanto a los mecanismos que pueden explicar esa mayor contribución de la región NTAD/CTAD de HIF2 $\alpha$ , se ha involucrado a USF2 con la expresión de genes dependientes de HIF2 $\alpha$  como *EPO* y *PAI-1*, relacionado con la interacción física entre USF2 y la región NTAD/CTAD de HIF2 $\alpha$  (Pawlus et al., 2012; Pawlus et al., 2013). Por lo tanto, es posible que USF2 también participe en la expresión dependiente de HIF2 $\alpha$  de los demás genes analizados como *PHD3*, *OCT-4*, *NDRG1*, *TGFA*, *GLUT1*, *CCND1* y *SLC7A5* en células de carcinoma renal. Como hemos comentado, nuestros datos no pueden descartar una cierta contribución de la región bHLH-PAS de HIF2 $\alpha$  para conferir su especificidad transcripcional. En esta línea, se ha propuesto que el factor de transcripción ETS-1 aumenta la selectividad de HIF2 $\alpha$  interaccionando con el dominio bHLH-PAS de la isoforma de HIF2 $\alpha$  (Elvert et al., 2003). Del mismo modo que

ETS-1, Elk-1 es otro factor de transcripción de la familia ETS que se ha propuesto como otro participante en la especificidad de HIF2 $\alpha$ . De nuevo es posible que la participación de la región bHLH-PAS de HIF2 $\alpha$  requiera de la interacción con ETS-1 confiriendo así una base molecular sobre los distintos patrones de unión al ADN de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en algunos genes dependientes de HIF (Smythies et al., 2019).

En general, nuestros datos extienden el análisis sobre la selectividad de las proteínas HIF a un escenario biológico *in vivo* donde mostramos que la selectividad de HIF por sus genes diana se conserva en humanos y ratones en muchos - no todos - de los genes analizados, como *SLC7A5*, *PHD3*, *NDRG1* o *TGFA*. Estos datos sugieren que el mecanismo que subyace a la selectividad de las proteínas HIF se han conservado a lo largo de la evolución, lo que refleja la relevancia biológica de mantener la especificidad de acción de las subunidades HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ . Por otra parte, hemos mostrado la implicación de ambas regiones bHLH-PAS y NTAD/CTAD de HIF1 $\alpha$  y la mayor relevancia de la región NTAD/CTAD de HIF2 $\alpha$  en la especificidad por sus genes diana. Sin embargo, serán necesarios estudios adicionales para comprender la base molecular que mantiene las preferencias transcripcionales de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  conservadas en escenarios *in vitro* en *in vivo*, así como en diferentes especies.

## PARTE II

El transportador de aminoácidos LAT1/CD98 ha emergido como una diana terapéutica frente al tratamiento del cáncer. En este sentido LAT1/CD98 potencia la proliferación autónoma de la célula tumoral y por tanto la progresión de diversos tipos de cáncer (Cormerais et al., 2016; Elorza et al., 2012; Fuchs & Bode, 2005; Kaira et al., 2008; Kobayashi et al., 2008; Sampedro-Núñez et al., 2020). LAT1/CD98 permite la entrada de aminoácidos esenciales - entre los que destaca la leucina - que no solo se incorporan a las proteínas de nueva síntesis sino que promueven la activación de mTORC1 (Elorza et al., 2012; Milkereit et al., 2015; Nicklin et al., 2009). Además, LAT1/CD98 se ha mostrado especialmente relevante en la activación de los linfocitos T donde es esencial no solo para la activación de mTORC1 sino en la estabilización del factor de transcripción pro-proliferativo c-Myc (Sinclair et al., 2013). En esta línea, recientemente se ha constatado que la inactivación específica de LAT1/CD98 en linfocitos T disminuye la inflamación cutánea en modelos de psoriasis ya que impide la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de linfocitos T CD4, Th17 y linfocitos T  $\gamma/\delta$ , además de ser esencial para la diferenciación de los linfocitos T (Cibrian et al., 2020; Sinclair et al., 2013). Estos estudios han permitido contemplar la inhibición de



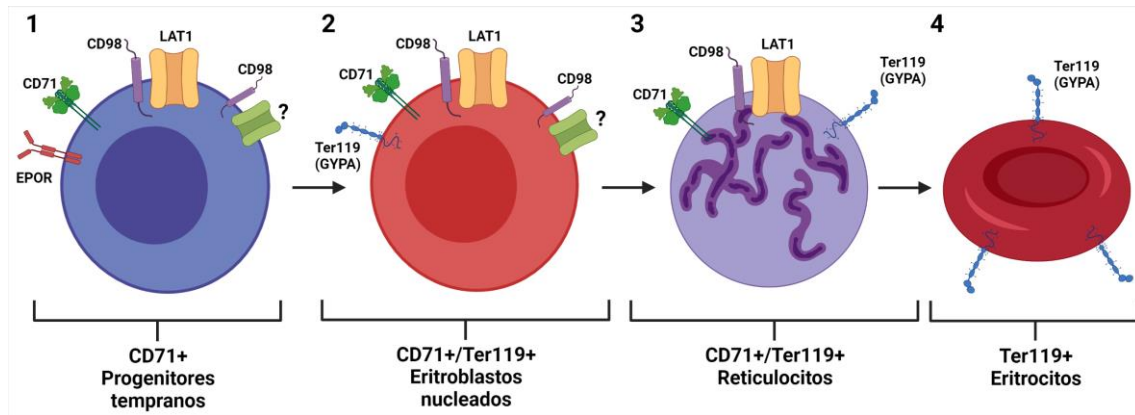
LAT1 como una oportunidad terapéutica para contrarrestar no solo el desarrollo tumoral sino patologías de marcado carácter inflamatorio. En este contexto es urgente conocer el papel fisiopatológico de LAT1/CD98 en otros escenarios no tumorales e inflamatorios no solo por su mero interés científico sino para anticipar y quizá combatir los posibles efectos adversos de la inhibición sistémica de LAT1/CD98 en patologías tumorales o inflamatorias. Además, este conocimiento puede ayudar a diseñar nuevas terapias basadas en el metabolismo de aminoácidos (quizá aporte de aminoácidos esenciales) en el contexto de otras patologías no estrictamente relacionadas con el cáncer o las patologías eminentemente inflamatorias.

Por lo tanto, decidimos evaluar el papel de LAT1/CD98 en la maduración de los eritrocitos ya que este proceso está asociado a una constante renovación y una alta demanda de aminoácidos requerida para la síntesis de proteínas tales como la hemoglobina. En primer lugar, encontramos que LAT1/CD98 ya se expresa en los primeros estadios de la diferenciación eritroide en la población CD71+/Ter119- que incluyen proeritroblastos, BFU-E y CFU-E. Esta expresión continua en la población intermedia CD71+/Ter119+ y termina perdiéndose en los últimos estadios de maduración (Ter119+/CD71-) que incluyen a los eritrocitos maduros (Figura 33). Además, nuestros datos muestran que LAT1/CD98 parece el transportador preponderante (de los que heterodimerizan con CD98) que se expresa en reticulocitos que es uno de los estadios donde se sintetiza hemoglobina en mayor medida (Arlet et al., 2016; Chen & Zhang, 2019). Debe también destacarse que la expresión de LAT1 tiene lugar en paralelo a la de CD71 ya que la expresión de LAT1 está precisamente elevada en los precursores CD71+/Ter119+ doble positivos, pero se pierde al alcanzar el estadio de eritrocitos maduros tal y como ocurre con CD71 (Figura 33). En este sentido, puede considerarse que los eritrocitos realizan una carga simultánea de aminoácidos y hierro vía LAT1/CD98 y CD71 respectivamente, fundamentalmente en las etapas intermedias de maduración (precursores CD71+/Ter119+ doble positivos) y que esta carga ya no es operativa en los eritrocitos maduros.

La expresión LAT1/CD98 no solo se detecta en condiciones basales, sino que su expresión también se induce en los precursores eritroides esplénicos en distintos modelos de anemia empleados, tales como el tratamiento con fenilhidrazina (moderado con PHZ 40 µg/g o más agresivo con 2 dosis de PHZ 60 µg/g) o la flebotomía. Como mostramos en este estudio esta inducción se pone de manifiesto en los precursores CD71+/Ter119- y CD71+/Ter119+ doble positivos presentes en el bazo. Las células CD71+/Ter119- presentan una marcada inducción de CD98 en condiciones de anemia, aunque esta señal disminuye solo parcialmente en los

animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* sugiriendo que otros transportadores de aminoácidos que heterodimerizan con CD98 (Figura 3 Introducción) pueden inducirse en estos precursores iniciales CD71+/Ter119- en condiciones de anemia. Tampoco puede descartarse que algunos de estos precursores iniciales tengan una expresión aun baja de EPOR y por lo tanto no pueda darse la expresión óptima de la recombinasa cre que promueve la inactivación de LAT1 en los animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*. Por otro lado, en cuanto a las células CD71+/Ter119+ doble positivas esplénicas, éstas son en realidad un grupo heterogéneo de distintas subpoblaciones (Chen et al., 2009). Nuestro análisis muestra que existe un grupo de células CD71+/Ter119+ doble positivas que son reticulocitos identificados por su pequeño tamaño y por su baja (no nula) señal de DRAQ5 compatible con la detección únicamente de ARN característica de los reticulocitos (Figura 33). Por otra parte, existen otros precursores CD71+/Ter119+ doble positivos esplénicos que son nucleados en base a su alta señal de DRAQ5 y de un tamaño variable pero en general de mayor tamaño que los reticulocitos lo cual es compatible con ser precursores eritroides nucleados basófilos, policromáticos u ortocromáticos (Figura 33). Las células CD71+/Ter119+ esplénicas nucleadas pierden solo parcialmente la señal de CD98 en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* indicando que - al igual que en los precursores CD71+/Ter119- - otros transportadores de aminoácidos que heterodimerizan con CD98 distintos de LAT1 también se expresen en estos eritroblastos CD71+/Ter119+ nucleados. Sin embargo, los reticulocitos CD71+/Ter119+ esplénicos de los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* pierden la señal de CD98 en mayor medida que en los eritroblastos CD71+/Ter119+ nucleados indicando que - a diferencia del grupo de CD71+/Ter119+ nucleadas - LAT1 es la subunidad preponderante que heterodimeriza con CD98 en reticulocitos (Figura 33). También debe comentarse que la pérdida parcial de CD98 en los precursores nucleados no parece deberse a una ineficiente inactivación de *Slc7a5* en el linaje eritroide ya que si esto hubiera sido así deberíamos haber detectado reticulocitos (que es un estadio posterior) con una señal similar a los animales control o la mitad de esta correspondiente a la pérdida de uno de los alelos, y esto no se observa en nuestros perfiles de citometría. Por otro lado - a diferencia de las CD71+/Ter119+ nucleadas que solo se encuentran en bazo - los reticulocitos CD71+/Ter119+ se detectan tanto en el bazo como en sangre periférica indicando que solo los reticulocitos pueden saltar a sangre periférica tal y como está bien documentado (Moras et al., 2017; Palis, 2014). Estos reticulocitos CD71+/Ter119+ aumentan en circulación en los primeros días tras la inducción de la anemia y decaen progresivamente según se va recuperando el hematocrito en línea son su capacidad de diferenciarse a eritrocitos ya en circulación. Por último - tal y como se aprecia en el

bazo - los reticulocitos CD71+/Ter119+ circulantes inducen LAT1/CD98 en condiciones de anemia y la expresión de CD98 decae muy fuertemente en los ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*. Por lo tanto, el heterodímero LAT1/CD98 es preponderante frente a otros posibles heterodímeros de CD98 implicados en el transporte de aminoácidos tanto en reticulocitos esplénicos como en circulantes derivados de estos.



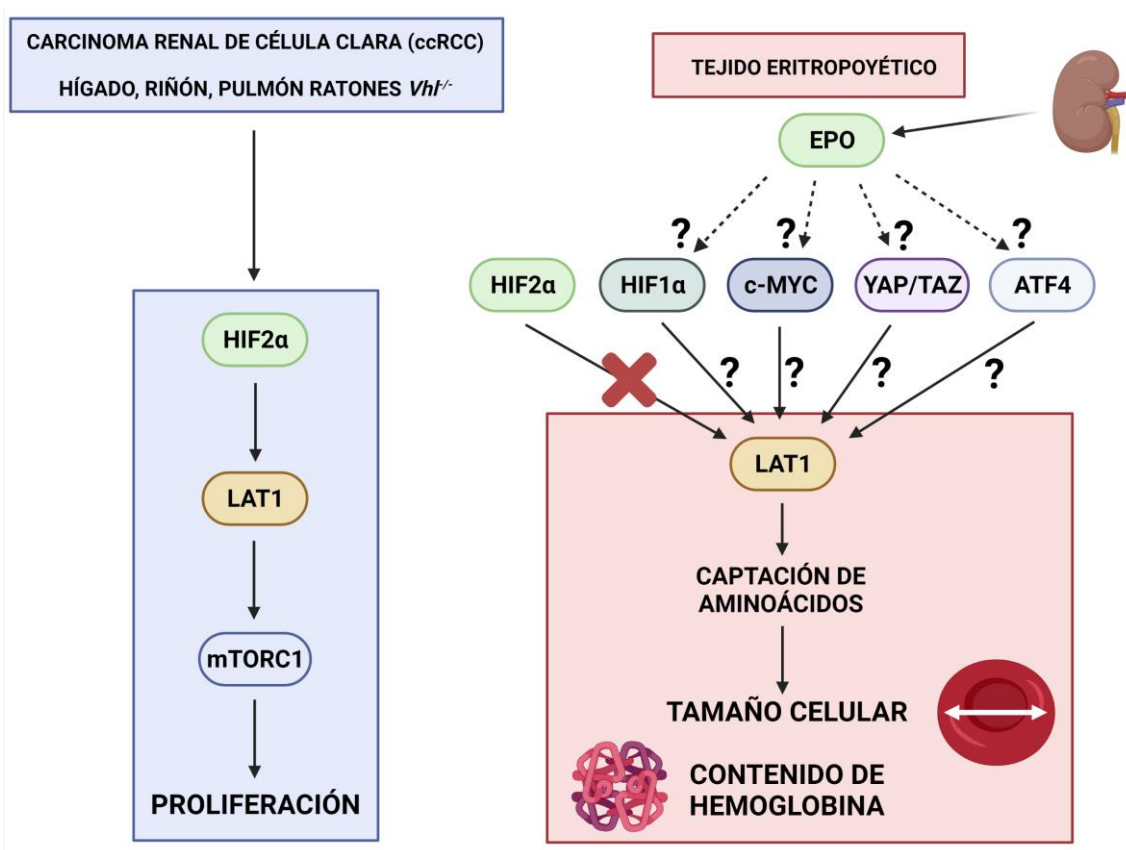
**Figura 33. Patrón de expresión en superficie de LAT1/CD98 durante la diferenciación eritroide.** (1) Los progenitores tempranos caracterizados por la expresión de CD71, EPOR y negativos para Ter119 (GYPA) expresan CD98 asociado a LAT1 (transportador color amarillo) pero posiblemente también a otros transportadores de aminoácidos (indicado con una ? y de color verde). (2) En los eritroblastos nucleados que pierden la expresión de EPOR y comienzan a expresar Ter119 (GYPA) expresan también CD98 asociado a LAT1 (transportador color amarillo) pero posiblemente también a otros transportadores de aminoácidos (indicado con una ? y de color verde). (3) En el estadio de reticulocito (células CD71+/Ter119+ enucleadas) el transportador mayoritario asociado a CD98 es LAT1 (transportador color amarillo). (4) Finalmente se pierde su expresión en el estadio de eritrocito donde únicamente se mantiene la expresión de Ter119 (GYPA).

Un aspecto relevante - que hemos tratado solo parcialmente en esta tesis doctoral - es el referente a los mecanismos que median la inducción de LAT1 en los precursores eritroides. La diferenciación eritroide es una respuesta central a la hipoxia sistémica que se induce por la EPO producida en el tejido renal tras la activación de la isoforma HIF2 $\alpha$ . Teniendo en cuenta que HIF2 $\alpha$  es esencial para la activación de *SLC7A5* en varios escenarios biológicos (Bouthelier et al., 2020; Elorza et al., 2012; Onishi et al., 2019), nuestro estudio contempló la posibilidad de que HIF2 $\alpha$  fuera relevante en eritropoyesis - no solo por su capacidad para promover la producción de EPO en el riñón - sino porque HIF2 $\alpha$  se expresara en los propios precursores eritroides durante el estrés eritropoyético. Además, esta hipótesis se sustentaba en el hecho de que HIF2 $\alpha$  promueve la proliferación de las células del carcinoma renal de célula clara, las células del cuerpo carotídeo para el control de la ventilación o las células del epitelio bronquial

(Elorza et al., 2012; Hodson et al., 2016; Torres-Capelli et al., 2016). Además, nuestros datos previos indican que HIF2 $\alpha$  es un potente inductor de la expresión de *SLC7A5* en carcinoma renal, así como en otros escenarios como el pulmón (Elorza et al., 2012). Por lo tanto, de manera general nos planteamos si HIF2 $\alpha$  también podría expresarse en los precursores eritroides con el fin de promover la proliferación de los precursores eritroides y la inducción de LAT1/CD98. Nuestros datos empleando ratones *ErGFPcre HIF2 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* han evidenciado la presencia de ARNm de HIF2 $\alpha$  en las células del linaje eritroide. Este análisis se ha realizado con ARN de bazo por lo que, aunque podemos asegurar la presencia de ARNm de HIF2 $\alpha$  en el linaje eritroide no hemos evaluado en cual (o cuales) de los diferentes estadios de diferenciación eritroide se expresa HIF2 $\alpha$  a nivel de proteína. Al margen de estas consideraciones nuestros datos indican - a diferencia de otros escenarios - que la inactivación de HIF2 $\alpha$  en el linaje eritroide no afecta a la expresión de LAT1/CD98 en precursores eritroides (Figura 34). A este respecto debe también comentarse que nuestros datos indican que, aunque el ARNm de HIF2 $\alpha$  se expresa en el linaje eritroide la expresión podría ser moderada ya que la señal del ARNm de HIF2 $\alpha$  truncado en los ratones *ErGFPcre Hif2 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup>* es modesta cuando se compara con el ARNm HIF2 $\alpha$  que permanece intacto (Figura 27B, Resultados). Además, cuando se utiliza una línea de ratón que inactiva HIF2 $\alpha$  de manera ubicua, se observa que efectivamente la mayoría del ARNm de HIF2 $\alpha$  presente en el bazo está truncado (Figura 27B, Resultados). Estos datos nos permiten anticipar que la expresión de HIF2 $\alpha$  en el bazo podría ser limitada en el linaje eritroide - en línea con su falta de efecto en la inducción de LAT1 - pero sí ser más alta en otros tipos celulares presentes en el bazo. En esta misma línea trabajos previos han desvelado una expresión relevante de HIF2 $\alpha$  en el endotelio del bazo (Yamashita et al., 2008) donde HIF2 $\alpha$  controla la expresión endotelial de la molécula de adhesión VCAM-1 que interacciona con su ligando VLA-4 expresado en los precursores eritroides (Yamashita et al., 2008) facilitando así su proliferación.

¿Qué otros factores podrían controlar la expresión de LAT1 en los precursores eritroides? Un estudio reciente ha desvelado que - aunque HIF2 $\alpha$  es el mediador que más se ha asociado a la inducción de LAT1 en condiciones de hipoxia o en ausencia de *VHL* - la isoforma HIF1 $\alpha$  también puede controlar la inducción de LAT1 en células de glioblastoma (Zhang et al., 2020). En este sentido, es posible que la hipoxia local esperable en el bazo en condiciones de anemia induzca HIF1 $\alpha$  en los precursores eritroides para inducir LAT1. Sin embargo - aunque no puede descartarse la participación de HIF1 $\alpha$  - si debe comentarse que HIF2 $\alpha$  - y no HIF1 $\alpha$  - es el regulador central de la eritropoyesis (Haase, 2013; Kapitsinou et al., 2010; Rankin et al., 2007) y

además HIF1 $\alpha$  se ha asociado a la represión de la proliferación autónoma de célula (Carmeliet et al., 1998; Gordan et al., 2007; Hubbi et al., 2013; Kondo et al., 2003; Koshiji et al., 2004; Meléndez-Rodríguez et al., 2019; Shen et al., 2011) lo que podría ser incompatible con la expansión de precursores eritroides en condiciones de anemia (Figura 34). Por otro lado, debe destacarse que se han identificado otros reguladores transcripcionales distintos de los factores HIF implicados en el control de la transcripción de *SLC7A5*. Entre ellos destaca el factor pro-proliferativo c-Myc el cual se une - al igual que HIF2 $\alpha$  - a la región proximal del promotor de *SLC7A5* para promover su transcripción (Yue et al., 2017). Además, varios estudios han desvelado el papel central de c-Myc en la proliferación de los eritroblastos (Figura 34) (Dubois et al., 2008; He et al., 2008). Por otro lado, los reguladores transcripcionales YAP1 y TAZ - implicados en el control de la proliferación celular - se han identificado como inductores de la expresión de *SLC7A5* en el contexto del hepatocarcinoma (Park et al., 2016). Además, un estudio reciente ha identificado que YAP1 promueve la proliferación de precursores eritroides en el ámbito de la eritropoyesis de estrés (Hao, et al., 2019) lo que podría hacer considerar a YAP1 como uno de los responsables potenciales de la inducción de LAT1/CD98 en condiciones de anemia (Figura 34). Otro factor implicado en la regulación de LAT1 es el factor de respuesta a estrés de retículo ATF4 (Chen et al., 2014) aunque quizá pueda tener menos cabida en este escenario teniendo en cuenta que la eritropoyesis es un proceso de proliferación activa y la respuesta a estrés de retículo probablemente comprometa la proliferación celular. Por último, también debe considerarse - independientemente del regulador transcripcional que promueva el aumento de LAT1 - en los precursores eritroides es posible que su inducción se deba de manera primaria a la elevación de EPO circulante. En este sentido, es concebible que una mayor activación del receptor de EPO en condiciones de anemia promueva una señalización en los precursores iniciales EPOR+ que desencadene la elevación de LAT1 en los precursores iniciales CD71+/Ter119- y que esta se mantenga en los estadios posteriores intermedios tales como las células CD71+/Ter119+ doble positivas nucleadas en el bazo y reticulocitos CD71+/Ter119+ en el bazo y en sangre periférica (ver más arriba) (Figura 34).



**Figura 34. Factores de transcripción relacionados con la activación de LAT1 en diferentes escenarios biológicos.** HIF2 $\alpha$  controla la expresión de LAT1 en ccRCC, hígado, riñón y pulmón de animales *Vhl*<sup>-/-</sup> donde se ha asociado - especialmente en ccRCC - a la proliferación celular mediante la activación de mTORC1. Sin embargo, HIF2 $\alpha$  no controla la expresión de LAT1 en el linaje eritroide, quizá otros factores de transcripción como HIF1 $\alpha$ , c-Myc, YAP/TAZ o ATF4 puedan ser los responsables de su inducción en condiciones de estrés eritropoyético. El esquema también plantea la posibilidad de que EPO sea el coordinador general que inicie - vía estos factores de transcripción - la inducción de LAT1/CD98 en el linaje eritroide. LAT1 controla el tamaño celular y el contenido de hemoglobina de las células eritroides mediante la captación de aminoácidos.

En lo referente al papel de LAT1/CD98 en la biología de los eritrocitos, nuestros datos han demostrado inequívocamente que la ausencia de LAT1/CD98 en el linaje eritroide disminuye el diámetro de las células rojas circulantes, así como su volumen corpuscular medio. Este papel de LAT1 en el tamaño celular de los eritrocitos quizá podría atribuirse a una menor tasa de síntesis de proteínas por inactivación de mTORC1 debido a una menor captación de leucina y/o a una deficiencia más general intracelular de aminoácidos esenciales que transporta LAT1/CD98 además de leucina como isoleucina, valina, fenilalanina, triptófano, tirosina, histidina o metionina (Cheng et al., 2011; Kanai et al., 1998; Lloyd, 2013). Además, la ausencia de LAT1 disminuye la hemoglobina corpuscular media que de nuevo podría deberse a una disminución en



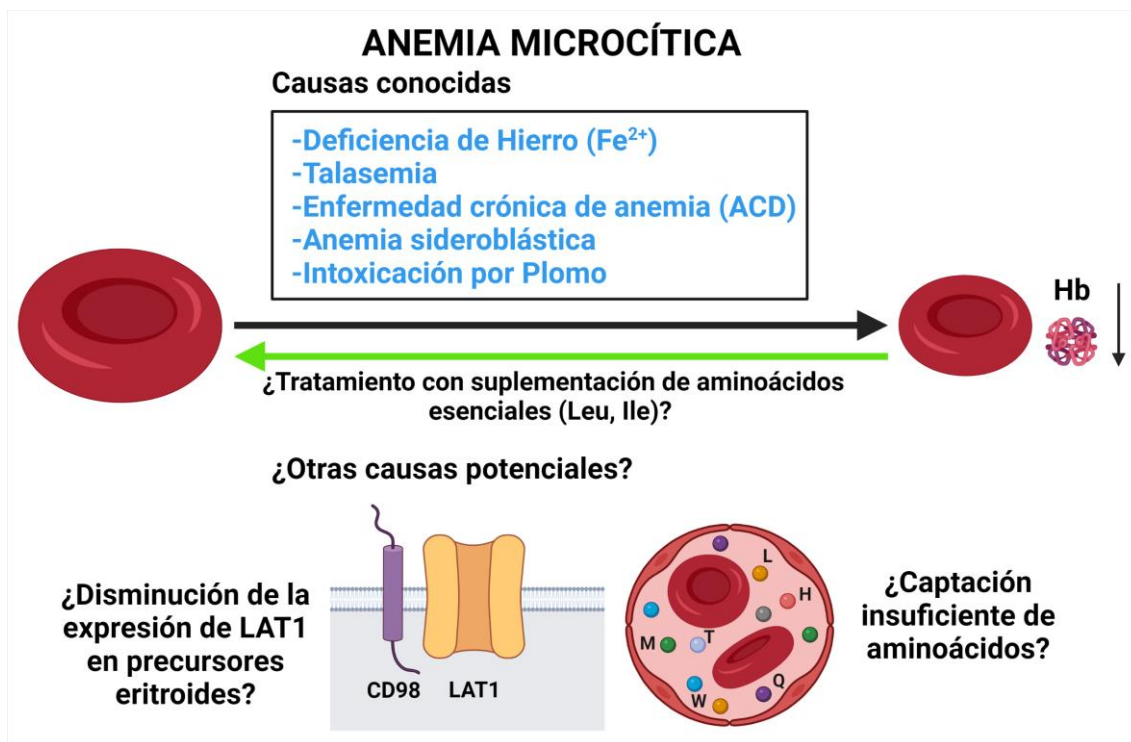
el aporte de aminoácidos necesario para la síntesis general de proteína y en particular de aquellas centrales en la biología de los eritroblastos como la hemoglobina. En esta línea, un estudio reciente en pez cebra ha demostrado que mTORC1/4EBP acopla la síntesis de hemoglobina a la captación de leucina, aunque este trabajo no parece detectar CD98 en eritroblastos y concede un mayor protagonismo a LAT3 (Chung et al., 2015). Al margen del tamaño celular, nuestro estudio ha revelado que sorprendentemente la deficiencia de LAT1 no parece afectar a la expansión de los eritroblastos durante el estrés eritropoyético. En este sentido, la deficiencia de LAT1 no afecta ni la esplenomegalia ni el número de células rojas circulantes tanto en condiciones basales como tras la inducción de la anemia. Estos datos podrían apuntar a que LAT1/CD98 no es necesario para la proliferación de los eritroblastos lo cual puede considerarse en primera instancia paradójico teniendo en cuenta el papel tan central que se le ha atribuido a LAT1 en la proliferación autónoma de célula al menos en células tumorales (Betsunoh et al., 2013; Cormerais et al., 2016; Elorza et al., 2012; Higuchi et al., 2019; Quan et al., 2020; Yue et al., 2017). Es posible que este papel de LAT1 en proliferación se ponga especialmente de manifiesto en células cancerígenas con una tasa de división elevada mientras que su contribución en procesos de proliferación no tumorales sea menor o nula. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la deficiencia de LAT1/CD98 en el linaje eritroide desencadena una respuesta compensatoria de hiper-eritropoyetinemia que permite anticipar una hipoxemia generalizada a consecuencia del menor tamaño y contenido de hemoglobina de las células circulantes. En este sentido, no podemos descartar que la deficiencia de LAT1/CD98 desencadene un defecto proliferativo inicial que sea compensado por un mayor nivel de EPO circulante que revigore la proliferación de los precursores eritroides y evite ver diferencias en el número de células eritroides circulantes, así como su expansión y esplenomegalia asociada. Por otro lado, es concebible que los otros transportadores de aminoácidos que heterodimerizan con CD98 que parecen presentes en células CD71+/Ter119- y CD71+/Ter119+ nucleadas puedan ser todavía competentes para mantener la proliferación. Por el contrario, en reticulocitos, LAT1/CD98 es el heterodímero dominante de los que son dependientes de CD98, y por lo tanto más vulnerables a su ausencia. En este sentido, nuestros datos indican que la deficiencia de LAT1/CD98 en el linaje eritroide disminuye la captación de aminoácidos esenciales que conlleva a una reducción de tamaño y el contenido de hemoglobina sin que pueda compensarse por otros transportadores de aminoácidos.

El fenotipo observado en los animales *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* podría relacionar la ausencia de LAT1/CD98 con el desarrollo de la anemia microcítica. Este tipo de

anemia se ha asociado principalmente a la deficiencia de hierro (Bainton & Finch, 1964; Brugnara, 2003; Camaschella, 2017; Nicolas et al., 2002). En este sentido, un estudio reciente ha desvelado que la deficiencia de hierro - por mecanismos que no se conocen en detalle - disminuye la actividad del activador de la síntesis de proteínas mTORC1 en las células de linaje eritroide. Esta disminución de mTORC1 se ha asociado a (i) una menor proliferación de los precursores eritroides así como una reducción de la esplenomegalia asociada durante el estrés eritropoyético (ii) una menor síntesis de hemoglobina y (iii) un menor volumen corpuscular medio característico de la anemia microcítica (Figura 35) (Knight et al., 2014). Nuestro estudio pone de manifiesto que deben considerarse otras variables - independientes del hierro circulante - más relacionadas con la biología de los aminoácidos que puedan estar relacionadas con aparición de la anemia microcítica en humanos. En primer lugar, nuestro estudio pone de manifiesto que LAT1/CD98 se expresa en reticulocitos circulantes en ratón. En esta línea, podría ser relevante evaluar si LAT1 se expresa en reticulocitos humanos circulantes y si dicha expresión tiene cierto valor diagnóstico o pronóstico en el contexto de la anemia microcítica (Figura 35). Por otro lado - de manera análoga al papel del hierro circulante en la anemia microcítica - podría ser relevante determinar el perfil de aminoácidos circulantes en pacientes anémicos y control con el fin de identificar si la disminución anómala de algún(os) aminoácido(s) en particular pueden asociarse a la aparición de la anemia microcítica. Especial atención debería prestarse a aquellos aminoácidos esenciales que transporta LAT1. A este respecto algún estudio previo ha mostrado que pacientes con deficiencia de hierro o anemia presentan niveles más bajos de triptófano en suero comparado con sujetos sanos (Wenninger et al., 2019). En esta misma línea, podría ser relevante determinar - mediante la administración específica de aminoácidos - si hay alguno de los aminoácidos que transporta LAT1 que pueda ser especialmente relevante para contrarrestar la anemia microcítica (Figura 35).

Por lo tanto, nuestro estudio ha definido una nueva función biológica del transportador LAT1/CD98 esencial para mantener un tamaño adecuado de reticulocitos y eritrocitos maduros. Al margen del avance científico básico que suponen nuestros datos, la información aportada en este estudio anima a considerar un análisis detallado de los parámetros hematológicos tales como hematocrito así como volumen y hemoglobina corpuscular media en pacientes que pudieran ser tratados con inhibidores farmacológicos de LAT1/CD98 en el contexto de patologías tumorales o inflamatorias donde - hasta la fecha - LAT1 se ha implicado de manera más notable (Elorza et al., 2012; Milkereit et al., 2015; Nicklin et al., 2009).





**Figura 35. Causas conocidas y potenciales de la anemia microcítica.** El esquema representa los diferentes escenarios clínicos que pueden desencadenar la anemia microcítica. La ausencia de LAT1 en el linaje eritroide produce una disminución en el tamaño de los eritrocitos que podría anticipar un cierto papel en la anemia microcítica donde la suplementación de aminoácidos esenciales puede ser un potencial tratamiento frente a esta forma de anemia. En la parte de abajo se representa el posible papel pronóstico o diagnóstico de la expresión de LAT1/CD98 en reticulocitos circulantes o de los aminoácidos circulantes que transporta LAT1/CD98.

En este contexto debe comentarse que los ratones heterocigotos para LAT1 en el linaje eritroide no presentan alteraciones hematológicas, indicando que, si los tratamientos farmacológicos inhiben solo parcialmente, quizá no conlleven ningún tipo de anemia asociada como efecto secundario. Esta circunstancia puede ser factible ya que parece fácil anticipar que los inhibidores de LAT1/CD98 no lleguen a inhibir su actividad tanto como en los propios ratones *ErGFPcre Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>*. Este tipo de consideraciones también deben realizarse en lo referente a estudios previos sobre la función fisiológica de LAT1/CD98 en otros tejidos. Por ejemplo, LAT1 presenta una expresión constitutiva en el endotelio de la barrera hematoencefálica donde controla el suministro de aminoácidos esenciales al tejido cerebral (Tărlungeanu et al., 2016). En este sentido, la inactivación completa de LAT1 en células endoteliales en modelos murinos desencadena una insuficiencia en el aporte de aminoácidos al tejido cerebral que cursa con signos compatibles con el autismo. Además, se han identificado polimorfismos de LAT1 en pacientes que padecen autismo reflejando la relevancia de

LAT1 en el aporte de aminoácidos al cerebro (Tărlungeanu et al., 2016). Por otro lado, estudios en embriones deficientes en LAT1 han permitido desvelar su papel en neurogénesis y el desarrollo de la cresta neural (Poncet et al., 2014). Por lo tanto, debería prestarse atención a posibles alteraciones del tejido nervioso central y periférico tras la inhibición presuntamente parcial - no total como en los ratones *Slc7a5<sup>LoxP/LoxP</sup>* - tras la administración de inhibidores de LAT1/CD98 de manera sistémica. En este mismo sentido también pueden considerarse posibles alteraciones de la función de la fibra muscular tras la administración de inhibidores específicos de LAT1/CD98 teniendo en cuenta su papel adicional en la captación de aminoácidos esenciales y la activación de mTORC1 en el músculo esquelético (Poncet et al., 2014).

Por lo tanto de manera general - y en línea con la idea central de este trabajo - es urgente conocer la contribución de LAT1 en fisiología con el fin de (i) avanzar, por supuesto, en la biología de este transportador de aminoácidos, (ii) considerar terapias basadas en la administración de aminoácidos esenciales para el tratamiento de ciertas patologías como la anemia microcítica y (iii) conocer posibles efectos secundarios al considerar terapias basadas en la inhibición sistémica con inhibidores de LAT1/CD98.

# CONCLUSIONES

## PARTE I

1. Los genes *CAIX*, *BNIP3* y *PGM1* regulados específicamente por HIF1 $\alpha$  en células WT8 requieren tanto la región de unión a ADN bHLH-PAS como la región de transactivación NTAD/CTAD de HIF1 $\alpha$ , mientras que la región de transactivación de HIF2 $\alpha$  es más relevante que la región bHLH-PAS para explicar la inducción de la expresión de genes específicos de HIF2 $\alpha$  como es el caso de *SLC7A5*.
2. La especificidad de la función transcripcional de las isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  se conserva en algunos genes como *SLC7A5* y *PHD3*, pero no en otros como *GLUT1* o *PGM1*, cuando se comparan el modelo *in vivo* de ratones deficientes en *Vhl* con el modelo de carcinoma renal *in vitro* de la línea celular WT8.

## PARTE II

3. CD98 se expresa en condiciones basales en la superficie de los progenitores eritroides CD71+/Ter119- y CD71+/Ter119+ dependiente en gran medida de la presencia de LAT1.
4. La expresión de CD98 aumenta en los progenitores eritroides esplénicos en condiciones de estrés eritropoyético inducida por fenilhidrazina o flebotomía.
5. En condiciones de estrés eritropoyético, la expresión en membrana de CD98 en reticulocitos esplénicos y circulantes es fundamentalmente dependiente de LAT1 mientras que CD98 puede expresarse en membrana de manera dependiente e independiente de LAT1 en progenitores eritroides CD71+/Ter119- y CD71+/Ter119+.
6. HIF2 $\alpha$ , a diferencia de otros escenarios biológicos, no controla la inducción de *SLC7A5* autónoma de célula en progenitores eritroides en condiciones de estrés eritropoyético.
7. La ausencia de LAT1 en el linaje eritroide no compromete el número de células rojas circulantes tanto en condiciones basales como de estrés eritropoyético pero disminuye específicamente el volumen corpuscular medio y el diámetro de las células eritroides circulantes y por tanto del hematocrito.
8. La hemoglobina circulante, así como la hemoglobina corpuscular media se reducen en los animales deficientes en LAT1 en el linaje eritroide.

9. Los animales deficientes en LAT1 en el linaje eritroide presentan una elevación en los niveles de EPO circulante (hiper-eritropoyetinemia) que puede interpretarse como posible signo de hipoxia sistémica asociada a sus defectos específicos en tamaño y en hemoglobina corpuscular media de las células rojas circulantes.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Adhikary, S., & Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm1703>
- Allan, R. W., Ansari-Lari, M. A., & Jordan, S. (2008). DRAQ5-based, no-lyse, no-wash bone marrow aspirate evaluation by flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology*, 129(5). <https://doi.org/10.1309/D2M6Q7BYHWAM1FYQ>
- Aragonés, J., Fraisl, P., Baes, M., & Carmeliet, P. (2009). Oxygen Sensors at the Crossroad of Metabolism. In *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.10.001>
- Aragonés, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M., Dirkx, R., Zacchigna, S., Lemieux, H., Jeoung, N. H., Lambrechts, D., Bishop, T., Lafuste, P., Diez-Juan, A., Harten, S. K., Van Noten, P., De Bock, K., Willam, C., Tjwa, M., ... Carmeliet, P. (2008). Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.62>
- Arlet, J. B., Dussiot, M., Moura, I. C., Hermine, O., & Courtois, G. (2016). Novel players in  $\beta$ -thalassemia dyserythropoiesis and new therapeutic strategies. In *Current Opinion in Hematology* (Vol. 23, Issue 3). <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000231>
- Bainton, D. F., & Finch, C. A. (1964). The diagnosis of iron deficiency anemia. *The American Journal of Medicine*, 37(1). [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(64\)90212-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(64)90212-8)
- Bassi, M. T., Gasol, E., Manzoni, M., Pineda, M., Riboni, M., Martín, R., Zorzano, A., Borsani, G., & Palacín, M. (2001). Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc-. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 442(2). <https://doi.org/10.1007/s004240100537>
- Bertout, J. A., Majmundar, A. J., Gordan, J. D., Lam, J. C., Ditsworth, D., Keith, B., Brown, E. J., Nathanson, K. L., & Simon, M. C. (2009). HIF2 $\alpha$  inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.0907357106>
- Betsunoh, H., Fukuda, T., Anzai, N., Nishihara, D., Mizuno, T., Yuki, H., Masuda, A., Yamaguchi, Y., Abe, H., Yashi, M., Fukabori, Y., Yoshida, K. I., & Kamai, T. (2013). Increased expression of system large amino acid transporter (LAT)-1 mRNA is associated with invasive potential and unfavorable prognosis of human clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-509>
- Beugnet, A., Tee, A. R., Taylor, P. M., & Proud, C. G. (2003). Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20021266>
- Bouthelie, A., & Aragonés, J. (2020). Role of the HIF oxygen sensing pathway in cell defense and proliferation through the control of amino acid metabolism. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1867, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118733>
- Bouthelie, A., Meléndez-Rodríguez, F., Urrutia, A. A., & Aragonés, J. (2020). Differential contribution of n-and c-terminal regions of hif1 $\alpha$  and hif2 $\alpha$  to their target gene selectivity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249401>

- Bracken, C. P., Fedele, A. O., Linke, S., Balrak, W., Lisy, K., Whitelaw, M. L., & Peet, D. J. (2006). Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *Journal of Biological Chemistry*, 281(32). <https://doi.org/10.1074/jbc.M600288200>
- Bröer, S., & Palacín, M. (2011). The role of amino acid transporters in inherited and acquired diseases. In *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20101912>
- Brugnara, C. (2003). Iron deficiency and erythropoiesis: New diagnostic approaches. In *Clinical Chemistry* (Vol. 49, Issue 10). <https://doi.org/10.1373/49.10.1573>
- Bunn, H. F. (2013). Erythropoietin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011619>
- Camaschella, C. (2017). New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. In *Blood Reviews* (Vol. 31, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.02.004>
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herber, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., & Keshet, E. (1998). Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/28867>
- Carroll, B., Maetzel, D., Maddocks, O. D., Otten, G., Ratcliff, M., Smith, G. R., Dunlop, E. A., Passos, J. F., Davies, O. R., Jaenisch, R., Tee, A. R., Sarkar, S., & Korolchuk, V. I. (2016). Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/elife.11058>
- Chan, D. A., Sutphin, P. D., Nguyen, P., Turcotte, S., Lai, E. W., Banh, A., Reynolds, G. E., Chi, J. T., Wu, J., Solow-Cordero, D. E., Bonnet, M., Flanagan, J. U., Bouley, D. M., Graves, E. E., Denny, W. A., Hay, M. P., & Giaccia, A. J. (2011). Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Science Translational Medicine*, 3(94). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002394>
- Chavez, J. C., Baranova, O., Lin, J., & Pichiule, P. (2006). The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2838-06.2006>
- Chen, J. J., & Zhang, S. (2019). Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase in erythropoiesis and hemoglobinopathies. In *Blood* (Vol. 134, Issue 20). <https://doi.org/10.1182/blood.2019001915>
- Chen, K., Liu, J., Heck, S., Chasis, J. A., An, X., & Mohandas, N. (2009). Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909296106>
- Chen, R., Zou, Y., Mao, D., Sun, D., Gao, G., Shi, J., Liu, X., Zhu, C., Yang, M., Ye, W., Hao, Q., Li, R., & Yu, L. (2014). The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. *Journal of Cell Biology*, 206(2). <https://doi.org/10.1083/jcb.201403009>
- Chen, W., Hill, H., Christie, A., Kim, M. S., Holloman, E., Pavia-Jimenez, A., Homayoun, F., Ma, Y., Patel, N., Yell, P., Hao, G., Yousuf, Q., Joyce, A., Pedrosa, I., Geiger, H., Zhang, H., Chang, J., Gardner, K. H., Bruick, R. K., ... Brugarolas, J. (2016). Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature19796>
- Cheng, L. Y., Bailey, A. P., Leever, S. J., Ragan, T. J., Driscoll, P. C., & Gould, A. P.



- (2011). Anaplastic lymphoma kinase spares organ growth during nutrient restriction in drosophila. *Cell*, 146(3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.040>
- Cho, H., Du, X., Rizzi, J. P., Liberzon, E., Chakraborty, A. A., Gao, W., Carvo, I., Signoretti, S., Bruick, R. K., Josey, J. A., Wallace, E. M., & Kaelin, W. G. (2016). On-target efficacy of a HIF-2 $\alpha$  antagonist in preclinical kidney cancer models. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature19795>
- Chow, A., Huggins, M., Ahmed, J., Hashimoto, D., Lucas, D., Kunisaki, Y., Pinho, S., Leboeuf, M., Noizat, C., Van Rooijen, N., Tanaka, M., Zhao, Z. J., Bergman, A., Merad, M., & Frenette, P. S. (2013). CD169 + macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nature Medicine*, 19(4). <https://doi.org/10.1038/nm.3057>
- Christie, G. R., Hajduch, E., Hundal, H. S., Proud, C. G., & Taylor, P. M. (2002). Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107694200>
- Chung, J., Bauer, D. E., Ghamari, A., Nizzi, C. P., Deck, K. M., Kingsley, P. D., Yien, Y. Y., Huston, N. C., Chen, C., Schultz, I. J., Dalton, A. J., Wittig, J. G., Palis, J., Orkin, S. H., Lodish, H. F., Eisenstein, R. S., Cantor, A. B., & Paw, B. H. (2015). The mTORC1/4E-BP pathway coordinates hemoglobin production with L-leucine availability. *Science Signaling*, 8(372). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa5903>
- Cibrian, D., Castillo-González, R., Fernández-Gallego, N., de la Fuente, H., Jorge, I., Saiz, M. L., Punzón, C., Ramírez-Huesca, M., Vicente-Manzanares, M., Fresno, M., Daudén, E., Fraga-Fernandez, J., Vazquez, J., Aragonés, J., & Sánchez-Madrid, F. (2020). Targeting L-type amino acid transporter 1 in innate and adaptive T cells efficiently controls skin inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.025>
- Cibrian, D., Saiz, M. L., De La Fuente, H., Sánchez-Díaz, R., Moreno-Gonzalo, O., Jorge, I., Ferrarini, A., Vázquez, J., Punzón, C., Fresno, M., Vicente-Manzanares, M., Daudén, E., Fernández-Salguero, P. M., Martín, P., & Sánchez-Madrid, F. (2016). CD69 controls the uptake of L-tryptophan through LAT1-CD98 and AhR-dependent secretion of IL-22 in psoriasis. *Nature Immunology*, 17(8). <https://doi.org/10.1038/ni.3504>
- Corbet, C., Draoui, N., Polet, F., Pinto, A., Drozak, X., Riant, O., & Feron, O. (2014). The SIRT1/HIF2 $\alpha$  axis drives reductive glutamine metabolism under chronic acidosis and alters tumor response to therapy. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0705>
- Cormerais, Y., Giuliano, S., LeFloch, R., Front, B., Durivault, J., Tambutté, E., Massard, P. A., De La Ballina, L. R., Endou, H., Wempe, M. F., Palacin, M., Parks, S. K., & Pouyssegur, J. (2016). Genetic disruption of the multifunctional CD98/LAT1 complex demonstrates the key role of essential amino acid transport in the control of mTORC1 and tumor growth. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3376>
- Covello, K. L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J. D., Arsham, A. M., Hu, C. J., Labosky, P. A., Simon, M. C., & Keith, B. (2006). HIF-2 $\alpha$  regulates Oct-4: Effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1399906>
- Criswell, K. A., Sulkanen, A. P., Hochbaum, A. F., & Bleavins, M. R. (2000). Effects of phenylhydrazine or phlebotomy on peripheral blood, bone marrow and erythropoietin in Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-)

1263(200001/02)20:1<25::AID-JAT624>3.0.CO;2-7

Dann, S. G., Ryskin, M., Barsotti, A. M., Golas, J., Shi, C., Miranda, M., Hosselet, C., Lemon, L., Lucas, J., Karnoub, M., Wang, F., Myers, J. S., Garza, S. J., Follettie, M. T., Geles, K. G., Klippel, A., Rollins, R. A., & Fantin, V. R. (2015). Reciprocal regulation of amino acid import and epigenetic state through Lat1 and EZH 2 . *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/embj.201488166>

Dayan, F., Roux, D., Brahimi-Horn, M. C., Pouyssegur, J., & Mazure, N. M. (2006). The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4564>

De La Ballina, L. R., Cano-Crespo, S., González-Muñoz, E., Bial, S., Estrach, S., Cailleateau, L., Tissot, F., Daniel, H., Zorzano, A., Ginsberg, M. H., Palacin, M., & Féral, C. C. (2016). Amino acid transport associated to cluster of differentiation 98 heavy chain (CD98HC) is at the cross-road of oxidative stress and amino acid availability. *Journal of Biological Chemistry*, 291(18). <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.704254>

Devés, R., & Boyd, C. A. R. (2000). Surface antigen CD98(4F2): Not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. In *Journal of Membrane Biology*. <https://doi.org/10.1007/s002320001017>

Doan, H., Parsons, A., Devkumar, S., Selvarajah, J., Miralles, F., & Carroll, V. A. (2019). HIF-mediated Suppression of DEPTOR Confers Resistance to mTOR Kinase Inhibition in Renal Cancer. *IScience*. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.047>

Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: A human perspective. In *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>

Dubois, N. C., Adolphe, C., Ehninger, A., Wang, R. A., Robertson, E. J., & Trumpp, A. (2008). Placental rescue reveals a sole requirement for c-Myc in embryonic erythroblast survival and hematopoietic stem cell function. *Development*, 135(14). <https://doi.org/10.1242/dev.022707>

Durán, R. V., Oppliger, W., Robitaille, A. M., Heiserich, L., Skendaj, R., Gottlieb, E., & Hall, M. N. (2012). Glutaminolysis Activates Rag-mTORC1 Signaling. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.043>

Dzierzak, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>

Eaves, C. J. (2015). Hematopoietic stem cells: Concepts, definitions, and the new reality. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-570200>

Ehrismann, D., Flashman, E., Genn, D. N., Mathioudakis, N., Hewitson, K. S., Ratcliffe, P. J., & Schofield, C. J. (2007). Studies on the activity of the hypoxia-inducible-factor hydroxylases using an oxygen consumption assay. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20061151>

Elliott, S., & Sinclair, A. M. (2012). The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. In *Biologics: Targets and Therapy*.

Elorza, A., Soro-Arnáiz, I., Meléndez-Rodríguez, F., Rodríguez-Vaello, V., Marsboom, G., de Cárcer, G., Acosta-Iborra, B., Albacete-Albacete, L., Ordóñez, A., Serrano-Oviedo, L., Giménez-Bachs, J. M., Vara-Vega, A., Salinas, A., Sánchez-Prieto, R., Martín del Río, R., Sánchez-Madrid, F., Malumbres, M., Landázuri, M. O., & Aragonés, J. (2012). HIF2 $\alpha$  Acts as an mTORC1 Activator through the Amino Acid Carrier SLC7A5. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.017>

- Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G., & Flamme, I. (2003). Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *Journal of Biological Chemistry*, 278(9). <https://doi.org/10.1074/jbc.M211298200>
- Fan, S. J., Snell, C., Turley, H., Li, J. L., McCormick, R., Perera, S. M. W., Heublein, S., Kazi, S., Azad, A., Wilson, C., Harris, A. L., & Goberdhan, D. C. I. (2016). PAT4 levels control amino-acid sensitivity of rapamycin-resistant mTORC1 from the Golgi and affect clinical outcome in colorectal cancer. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.363>
- Fielding, J. W., Hodson, E. J., Cheng, X., Ferguson, D. J. P., Eckardt, L., Adam, J., Lip, P., Maton-Howarth, M., Ratnayaka, I., Pugh, C. W., Buckler, K. J., Ratcliffe, P. J., & Bishop, T. (2018). PHD2 inactivation in Type I cells drives HIF-2 $\alpha$ -dependent multilineage hyperplasia and the formation of paraganglioma-like carotid bodies. *Journal of Physiology*, 596(18). <https://doi.org/10.1113/JP275996>
- Fort, J., De La Ballina, L. R., Burghardt, H. E., Ferrer-Costa, C., Turnay, J., Ferrer-Orta, C., Usón, I., Zorzano, A., Fernández-Recio, J., Orozco, M., Lizarbe, M. A., Fita, I., & Palacín, M. (2007). The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704524200>
- Fotiadis, D., Kanai, Y., & Palacín, M. (2013). The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. In *Molecular Aspects of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.007>
- Fraisl, P., Aragonés, J., & Carmeliet, P. (2009). Inhibition of oxygen sensors as a therapeutic strategy for ischaemic and inflammatory disease. In *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd2761>
- Fuchs, B. C., & Bode, B. P. (2005). Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: Partners in crime? In *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.04.005>
- Fujiwara, H., Nishimura, H., Irei, I., Akiyama, T., Hamazaki, S., Wada, H., Sugihara, T., & Sadahira, Y. (2017). Human bone marrow VCAM-1 + macrophages provide a niche for reactive and neoplastic erythropoiesis. *Kawasaki Medical Journal*, 43(2).
- Fukasawa, Y., Segawa, H., Kim, J. Y., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Matsuo, H., Cha, S. H., Endou, H., & Kanai, Y. (2000). Identification and characterization of a NA+-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13). <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9690>
- Furuya, M., Horiguchi, J., Nakajima, H., Kanai, Y., & Oyama, T. (2012). Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02151.x>
- Gifford, S. C., Derganc, J., Shevkoplyas, S. S., Yoshida, T., & Bitensky, M. W. (2006). A detailed study of time-dependent changes in human red blood cells: From reticulocyte maturation to erythrocyte senescence. *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06279.x>
- Gnaiger, E., Lassnig, B., Kuznetsov, A., Rieger, G., & Margreiter, R. (1998). Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *Journal of Experimental Biology*.
- Gordan, J. D., Bertout, J. A., Hu, C. J., Diehl, J. A., & Simon, M. C. (2007). HIF-2 $\alpha$

Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing c-Myc Transcriptional Activity. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.02.006>

Gordan, J. D., Lal, P., Dondeti, V. R., Letrero, R., Parekh, K. N., Oquendo, C. E., Greenberg, R. A., Flaherty, K. T., Rathmell, W. K., Keith, B., Simon, M. C., & Nathanson, K. L. (2008). HIF- $\alpha$  Effects on c-Myc Distinguish Two Subtypes of Sporadic VHL-Deficient Clear Cell Renal Carcinoma. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.10.016>

Gordan, J. D., Thompson, C. B., & Simon, M. C. (2007). HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. In *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.006>

Gregory, C. J., & Eaves, A. C. (1977). Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of 3 erythroid colony responses. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.v49.6.855.bloodjournal496855>

Gruber, M., Hu, C. J., Johnson, R. S., Brown, E. J., Keith, B., & Simon, M. C. (2007). Acute postnatal ablation of Hif-2 $\alpha$  results in anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608382104>

Grzes, K. M., Swamy, M., Hukelmann, J. L., Emslie, E., Sinclair, L. V., & Cantrell, D. A. (2017). Control of amino acid transport coordinates metabolic reprogramming in T-cell malignancy. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.160>

Guinot, A., Lehmann, H., Wild, P. J., & Frew, I. J. (2016). Combined deletion of Vhl, Trp53 and Kif3a causes cystic and neoplastic renal lesions. *Journal of Pathology*, 239(3). <https://doi.org/10.1002/path.4736>

Haase, V. H. (2013). Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.003>

Haase, V. H., Glickman, J. N., Socolovsky, M., & Jaenisch, R. (2001). Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1583>

Han, J. M., Jeong, S. J., Park, M. C., Kim, G., Kwon, N. H., Kim, H. K., Ha, S. H., Ryu, S. H., & Kim, S. (2012). Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.044>

Hansen, C. G., Ng, Y. L. D., Lam, W. L. M., Plouffe, S. W., & Guan, K. L. (2015). The Hippo pathway effectors YAP and TAZ promote cell growth by modulating amino acid signaling to mTORC1. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.140>

Hao, S., Matsui, Y., Lai, Z. C., & Paulson, R. F. (2019). Yap1 promotes proliferation of transiently amplifying stress erythroid progenitors during erythroid regeneration. *Experimental Hematology*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2019.11.002>

Hao, S., Xiang, J., Wu, D. C., Fraser, J. W., Ruan, B., Cai, J., Patterson, A. D., Lai, Z. C., & Paulson, R. F. (2019). Gdf15 regulates murine stress erythroid progenitor proliferation and the development of the stress erythropoiesis niche. *Blood Advances*, 3(14). <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000375>

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K. ichi, Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., & Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00833-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00833-4)

Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C., & Avruch, J.

- (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14484>
- Harlander, S., Schönerberger, D., Toussaint, N. C., Prummer, M., Catalano, A., Brandt, L., Moch, H., Wild, P. J., & Frew, I. J. (2017). Combined mutation in Vhl, Trp53 and Rb1 causes clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nature Medicine*, 23(7). <https://doi.org/10.1038/nm.4343>
- Hayashi, K., Jutabha, P., Endou, H., & Anzai, N. (2012). c-Myc is crucial for the expression of LAT1 in MIA Paca-2 human pancreatic cancer cells. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1878>
- He, C., Hu, H., Braren, R., Fong, S. Y., Trumpp, A., Carlson, T. R., & Wang, R. A. (2008). c-myc in the hematopoietic lineage is crucial for its angiogenic function in the mouse embryo. *Development*, 135(14). <https://doi.org/10.1242/dev.020131>
- Heinrich, A. C., Pelanda, R., & Klingmüller, U. (2004). A mouse model for visualization and conditional mutations in the erythroid lineage. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1442>
- Hewitson, K. S., Liénard, B. M. R., McDonough, M. A., Clifton, I. J., Butler, D., Soares, A. S., Oldham, N. J., McNeill, L. A., & Schofield, C. J. (2007). Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608337200>
- Hickey, M. M., Lam, J. C., Bezman, N. A., Rathmell, W. K., & Simon, M. C. (2007). Von Hippel-Lindau mutation in mice recapitulates Chuvash polycythemia via hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  signaling and splenic erythropoiesis. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI32614>
- Hickey, M. M., Richardson, T., Wang, T., Mosqueira, M., Arguiri, E., Yu, H., Yu, Q. C., Solomides, C. C., Morrissey, E. E., Khurana, T. S., Christofidou-Solomidou, M., & Simon, M. C. (2010). The von Hippel-Lindau Chuvash mutation promotes pulmonary hypertension and fibrosis in mice. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI36362>
- Higgins, J. M. (2015). Red Blood Cell Population Dynamics. In *Clinics in Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.10.002>
- Higuchi, K., Sakamoto, S., Ando, K., Maimaiti, M., Takeshita, N., Okunushi, K., Reien, Y., Imamura, Y., Sazuka, T., Nakamura, K., Matsushima, J., Furihata, T., Ikehara, Y., Ichikawa, T., & Anzai, N. (2019). Characterization of the expression of LAT1 as a prognostic indicator and a therapeutic target in renal cell carcinoma. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53397-7>
- Hodson, E. J., Nicholls, L. G., Turner, P. J., Llyr, R., Fielding, J. W., Douglas, G., Ratnayaka, I., Robbins, P. A., Pugh, C. W., Buckler, K. J., Ratcliffe, P. J., & Bishop, T. (2016). Regulation of ventilatory sensitivity and carotid body proliferation in hypoxia by the PHD2/HIF-2 pathway. *Journal of Physiology*, 594(5). <https://doi.org/10.1113/JP271050>
- Hoefflin, R., Harlander, S., Schäfer, S., Metzger, P., Kuo, F., Schönerberger, D., Adlesic, M., Peighambari, A., Seidel, P., Chen, C. yi, Consenza-Contreras, M., Jud, A., Lahrmann, B., Grabe, N., Heide, D., Uhl, F. M., Chan, T. A., Duyster, J., Zeiser, R., ... Frew, I. J. (2020). HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  differently regulate tumour development and inflammation of clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17873-3>



- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2003). Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2 $\alpha$  in Hypoxic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.24.9361-9374.2003>
- Hu, C. J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H., & Simon, M. C. (2007). The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ . *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-05-0419>
- Hu, J., Liu, J., Xue, F., Halverson, G., Reid, M., Guo, A., Chen, L., Raza, A., Galili, N., Jaffray, J., Lane, J., Chasis, J. A., Taylor, N., Mohandas, N., & An, X. (2013). Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-476390>
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., & Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.7987>
- Hubbi, M. E., Kshitiz, Gilkes, D. M., Rey, S., Wong, C. C., Luo, W., Kim, D. H., Dang, C. V., Levchenko, A., & Semenza, G. L. (2013). A nontranscriptional role for HIF-1 $\alpha$  as a direct inhibitor of DNA replication. *Science Signaling*. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003417>
- Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., & Kaelin, W. G. (1995). Tumour suppression by the human von hippel-lindau gene product. *Nature Medicine*, 1(8). <https://doi.org/10.1038/nm0895-822>
- Imai, H., Kaira, K., Oriuchi, N., Shimizu, K., Tominaga, H., Yanagitani, N., Sunaga, N., Ishizuka, T., Nagamori, S., Promchan, K., Nakajima, T., Yamamoto, N., Mori, M., & Kanai, Y. (2010). Inhibition of L-type amino acid transporter 1 has antitumor activity in non-small cell lung cancer. *Anticancer Research*.
- Iscove, N. N., Sieber, F., & Winterhalter, K. H. (1974). Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: Analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040830218>
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., & Kaelin, J. (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1059817>
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., & Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.12.2.149>
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2001). Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>
- Jewell, J. L., Kim, Y. C., Russell, R. C., Yu, F. X., Park, H. W., Plouffe, S. W., Tagliabracchi, V. S., & Guan, K. L. (2015). Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1259472>

- Ji, P. (2020). Finding erythroid stress progenitors: Cell surface markers revealed. In *Haematologica*. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.262493>
- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., & Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17771>
- Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. In *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>
- Kageyama, T., Nakamura, M., Matsuo, A., Yamasaki, Y., Takakura, Y., Hashida, M., Kanai, Y., Naito, M., Tsuruo, T., Minato, N., & Shimohama, S. (2000). The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02758-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02758-X)
- Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., Hisada, T., Kawashima, O., Kamide, Y., Ishizuka, T., Kanai, Y., Nakajima, T., & Mori, M. (2009). CD98 expression is associated with poor prognosis in resected non-small-cell lung cancer with lymph node metastases. *Annals of Surgical Oncology*. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0685-0>
- Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., Hisada, T., Tanaka, S., Ishizuka, T., Kanai, Y., Endou, H., Nakajima, T., & Mori, M. (2008). L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00969.x>
- Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., Takehana, K., Iemura, S. I., Natsume, T., & Mizushima, N. (2010). Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121699>
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K. I., Uchino, H., Takeda, E., & Endou, H. (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.23629>
- Kapitsinou, P. P., Liu, Q., Unger, T. L., Rha, J., Davidoff, O., Keith, B., Epstein, J. A., Moores, S. L., Erickson-Miller, C. L., & Haase, V. H. (2010). Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270322>
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00808-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00808-5)
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V. P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2003). GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00114-X)
- Klinger, P., Schietke, R. E., Warnecke, C., Swoboda, B., Wiesener, M., Hennig, F. F., & Gelse, K. (2011). Deletion of the oxygen-dependent degradation domain results in impaired transcriptional activity of hypoxia-inducible factors. *Transcription*. <https://doi.org/10.4161/trns.2.6.18619>
- Knight, Z. A., Schmidt, S. F., Birsoy, K., Tan, K., & Friedman, J. M. (2014). A critical role for mTORC1 in erythropoiesis and anemia. *ELife*, 3.

<https://doi.org/10.7554/eLife.01913>

Kobayashi, H., Liu, J., Urrutia, A. A., Burmakin, M., Ishii, K., Rajan, M., Davidoff, O., Saifudeen, Z., & Haase, V. H. (2017). Hypoxia-inducible factor prolyl-4-hydroxylation in FOXD1 lineage cells is essential for normal kidney development. *Kidney International*. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.06.015>

Kobayashi, H., Liu, Q., Binns, T. C., Urrutia, A. A., Davidoff, O., Kapitsinou, P. P., Pfaff, A. S., Olauson, H., Wemerson, A., Fogo, A. B., Fong, G. H., Gross, K. W., & Haase, V. H. (2016). Distinct subpopulations of FOXD1 stroma-derived cells regulate renal erythropoietin. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI83551>

Kobayashi, K., Ohnishi, A., Promsuk, J., Shimizu, S., Kanai, Y., Shiokawa, Y., & Nagane, M. (2008). Enhanced tumor growth elicited by L-type amino acid transporter 1 in human malignant glioma cells. *Neurosurgery*. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000316018.51292.19>

Koivunen, P., Hirsilä, M., Günzler, V., Kivirikko, K. I., & Myllyharju, J. (2004). Catalytic Properties of the Asparaginyl Hydroxylase (FIH) in the Oxygen Sensing Pathway Are Distinct from Those of Its Prolyl 4-Hydroxylases. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312254200>

Kondo, K., Kim, W. Y., Lechpammer, M., & Kaelin, W. G. (2003). Inhibition of HIF2 $\alpha$  is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000083>

Kondo, K., Kico, J., Nakamura, E., Lechpammer, M., & Kaelin, W. G. (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00043-0](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00043-0)

Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E. A., Horikawa, I., Barrett, J. C., & Huang, L. E. (2004). HIF-1 $\alpha$  induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600196>

Koshiji, M., To, K. K. W., Hammer, S., Kumamoto, K., Harris, A. L., Modrich, P., & Huang, L. E. (2005). HIF-1 $\alpha$  induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS $\alpha$  expression. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.015>

Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., & Bruick, R. K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.991402>

Lau, K. W., Tian, Y. M., Raval, R. R., Ratcliffe, P. J., & Pugh, C. W. (2007). Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor- $\alpha$  in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603675>

Le Vee, M., Jouan, E., Lecureur, V., & Fardel, O. (2016). Aryl hydrocarbon receptor-dependent up-regulation of the heterodimeric amino acid transporter LAT1 (SLC7A5)/CD98hc (SLC3A2) by diesel exhaust particle extract in human bronchial epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.11.014>

Lee, P. J., Jiang, B. H., Chin, B. Y., Iyer, N. V., Alam, J., Semenza, G. L., & Choi, A. M. K. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5375>



- Li, J., Hale, J., Bhagia, P., Xue, F., Chen, L., Jaffray, J., Yan, H., Lane, J., Gallagher, P. G., Mohandas, N., Liu, J., & An, X. (2014). Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-588806>
- Lloyd, A. C. (2013). The regulation of cell size. In *Cell* (Vol. 154, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.053>
- Macias, D., Cowburn, A. S., Torres-Torrelo, H., Ortega-Sáenz, P., López-Barneo, J., & Johnson, R. S. (2018). HIF-2 $\alpha$  is essential for carotid body development and function. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.34681>
- Mahon, P. C., Hirota, K., & Semenza, G. L. (2001). FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.924501>
- Mastrogiannaki, M., Matak, P., Delga, S., Deschemin, J. C., Vaulont, S., & Peyssonnaud, C. (2012). Deletion of HIF-2 $\alpha$  in the enterocytes decreases the severity of tissue iron loading in hepcidin knockout mice. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-380337>
- Mastrogiannaki, M., Matak, P., Keith, B., Simon, M. C., Vaulont, S., & Peyssonnaud, C. (2009). HIF-2 $\alpha$ , but not HIF-1 $\alpha$ , promotes iron absorption in mice. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI38499>
- McCracken, A. N., & Edinger, A. L. (2013). Nutrient transporters: The Achilles' heel of anabolism. In *Trends in Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.01.002>
- Meléndez-Rodríguez, F., Roche, O., Sanchez-Prieto, R., & Aragonés, J. (2018). Hypoxia-inducible factor 2-dependent pathways driving Von Hippel-Lindau-deficient renal cancer. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 8, Issue JUN). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00214>
- Meléndez-Rodríguez, F., Urrutia, A. A., Lorendeau, D., Rinaldi, G., Roche, O., Böğürücü-Seidel, N., Ortega Muelas, M., Mesa-Celler, C., Turiel, G., Bouthelier, A., Hernansanz-Agustín, P., Elorza, A., Escasany, E., Li, Q. O. Y., Torres-Capelli, M., Tello, D., Fuertes, E., Fraga, E., Martínez-Ruiz, A., ... Aragonés, J. (2019). HIF1 $\alpha$  Suppresses Tumor Cell Proliferation through Inhibition of Aspartate Biosynthesis. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.106>
- Menendez-Montes, I., Escobar, B., Palacios, B., Gómez, M. J., Izquierdo-Garcia, J. L., Flores, L., Jiménez-Borreguero, L. J., Aragonés, J., Ruiz-Cabello, J., Torres, M., & Martín-Puig, S. (2016). Myocardial VHL-HIF Signaling Controls an Embryonic Metabolic Switch Essential for Cardiac Maturation. *Developmental Cell*, 39(6). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.11.012>
- Milkereit, R., Persaud, A., Vanoaica, L., Guetg, A., Verrey, F., & Rotin, D. (2015). LPTM4b recruits the LAT1-4F2hc Leu transporter to lysosomes and promotes mTORC1 activation. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8250>
- Minamishima, Y. A., & Kaelin, W. G. (2010). Reactivation of hepatic EPO synthesis in mice after PHD loss. In *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1192811>
- Miró-Murillo, M., Elorza, A., Soro-Arnáiz, I., Albacete-Albacete, L., Ordoñez, A., Balsa, E., Vara-Vega, A., Vázquez, S., Fuertes, E., Fernández-Criado, C., Landázuri, M. O., & Aragonés, J. (2011). Acute Vhl gene inactivation induces cardiac HIF-Dependent erythropoietin gene expression. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022589>

- Moras, M., Lefevre, S. D., & Ostuni, M. A. (2017). From erythroblasts to mature red blood cells: Organelle clearance in mammals. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 8, Issue DEC). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01076>
- Morotti, M., Bridges, E., Valli, A., Choudhry, H., Sheldon, H., Wigfield, S., Gray, N., Zois, C. E., Grimm, F., Jones, D., Teoh, E. J., Cheng, W. C., Lord, S., Anastasiou, D., Haider, S., McIntyre, A., Goberdhan, D. C. I., Buffa, F., & Harris, A. L. (2019). Hypoxia-induced switch in SNAT2/SLC38A2 regulation generates endocrine resistance in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818521116>
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V. E., MacKeigan, J. P., Porter, J. A., Wang, Y. K., Cantley, L. C., Finan, P. M., & Murphy, L. O. (2009). Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.044>
- Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Sirito, M., Sawadogo, M., Kahn, A., & Vaulont, S. (2002). Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.072632499>
- Nilsson, J. A., & Cleveland, J. L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. In *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207261>
- O'Rourke, J. F., Tian, Y. M., Ratcliffe, P. J., & Pugh, C. W. (1999). Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: Comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2060>
- Ohgaki, R., Ohmori, T., Hara, S., Nakagomi, S., Kanai-Azuma, M., Kaneda-Nakashima, K., Okuda, S., Nagamori, S., & Kanai, Y. (2017). Essential Roles of L-Type Amino Acid Transporter 1 in Syncytiotrophoblast Development by Presenting Fusogenic 4F2hc. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.00427-16>
- Onishi, Y., Hiraiwa, M., Kamada, H., Iezaki, T., Yamada, T., Kaneda, K., & Hinoi, E. (2019). Hypoxia affects Slc7a5 expression through HIF-2 $\alpha$  in differentiated neuronal cells. *FEBS Open Bio*. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12559>
- Ortega-Sáenz, P., & López-Barneo, J. (2020). Physiology of the Carotid Body: From Molecules to Disease. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 82). <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114427>
- Palis, J. (2014). Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. In *Frontiers in Physiology: Vol. 5 JAN*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00003>
- Pan, J., Yeger, H., Ratcliffe, P., Bishop, T., & Cutz, E. (2012). Hyperplasia of pulmonary neuroepithelial bodies (NEB) in lungs of prolyl hydroxylase -1(PHD-1) deficient mice. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 758. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4584-1\\_21](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4584-1_21)
- Park, Y.-Y., Sohn, B. H., Johnson, R. L., Kang, M.-H., Kim, S. B., Shim, J.-J., Mangala, L. S., Kim, J. H., Yoo, J. E., Rodriguez-Aguayo, C., Pradeep, S., Hwang, J. E., Jang, H.-J., Lee, H.-S., Rupaimoole, R., Lopez-Berestein, G., Jeong, W., Park, I. S., Park, Y. N., ... Lee, J.-S. (2016). YAP1 and TAZ activates mTORC1 pathway by regulating amino acid transporters in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*.
- Paulson, R. F., Ruan, B., Hao, S., & Chen, Y. (2020). Stress Erythropoiesis is a Key Inflammatory Response. In *Cells* (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/cells9030634>

- Paulson, R. F., Shi, L., & Wu, D. C. (2011). Stress erythropoiesis: New signals and new stress progenitor cells. *Current Opinion in Hematology*. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834521c8>
- Pawlus, M. R., Wang, L., & Hu, C. J. (2014). STAT3 and HIF1 $\alpha$  cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.115>
- Pawlus, M. R., Wang, L., Ware, K., & Hu, C.-J. (2012). Upstream Stimulatory Factor 2 and Hypoxia-Inducible Factor 2 (HIF2) Cooperatively Activate HIF2 Target Genes during Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.00724-12>
- Pawlus, Matthew R., Wang, L., Murakami, A., Dai, G., & Hu, C. J. (2013). STAT3 or USF2 Contributes to HIF Target Gene Specificity. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072358>
- Pelletier, J., Bellot, G., Gounon, P., Lacas-Gervais, S., Pouysségur, J., & Mazure, N. M. (2012). Glycogen synthesis is induced in hypoxia by the hypoxia-inducible factor and promotes cancer cell survival. *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00018>
- Perry, J. M., Harandi, O. F., & Paulson, R. F. (2007). BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016154>
- Persson, C. U., von Stedingk, K., Fredlund, E., Bexell, D., Pählman, S., Wigerup, C., & Mohlin, S. (2020). ARNT-dependent HIF-2 transcriptional activity is not sufficient to regulate downstream target genes in neuroblastoma. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111845>
- Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S., & Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.046>
- Pineda, M., Fernández, E., Torrents, D., Estévez, R., López, C., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, A., & Palacín, M. (1999). Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 274(28). <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19738>
- Poncet, Nadège, Halley, P. A., Lipina, C., Gierliński, M., Dady, A., Singer, G. A., Febrer, M., Shi, Y., Yamaguchi, T. P., Taylor, P. M., & Storey, K. G. (2020). Wnt regulates amino acid transporter Slc7a5 and so constrains the integrated stress response in mouse embryos. *EMBO Reports*, 21(1). <https://doi.org/10.15252/embr.201948469>
- Poncet, Nadège, Mitchell, F. E., Ibrahim, A. F. M., McGuire, V. A., English, G., Arthur, J. S. C., Shi, Y. B., & Taylor, P. M. (2014). The catalytic subunit of the system L1 amino acid transporter (Slc7a5) facilitates nutrient signalling in mouse skeletal muscle. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089547>
- Poncet, Nadege, Shi, Y., Taylor, P., & Storey, K. (2014). LAT1 (Slc7a5) null mice are embryonic lethal and exhibit neural tube defects (896.5). *The FASEB Journal*, 28(S1). [https://doi.org/10.1096/fasebj.28.1\\_supplement.896.5](https://doi.org/10.1096/fasebj.28.1_supplement.896.5)
- Qian, Z. M., Li, H., Sun, H., & Ho, K. (2002). Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. In *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.54.4.561>

- Quan, L., Ohgaki, R., Hara, S., Okuda, S., Wei, L., Okanishi, H., Nagamori, S., Endou, H., & Kanai, Y. (2020). Amino acid transporter LAT1 in tumor-associated vascular endothelium promotes angiogenesis by regulating cell proliferation and VEGF-A-dependent mTORC1 activation. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 39(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01762-0>
- Rankin, E. B., Higgins, D. F., Walisser, J. A., Johnson, R. S., Bradfield, C. A., & Haase, V. H. (2005). Inactivation of the Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (Arnt) Suppresses von Hippel-Lindau Disease-Associated Vascular Tumors in Mice. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.8.3163-3172.2005>
- Rankin, Erinn B., Biju, M. P., Liu, Q., Unger, T. L., Rha, J., Johnson, R. S., Simon, M. C., Keith, B., & Haase, V. H. (2007). Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI30117>
- Ratcliffe, P., Pan, J., Bishop, T., Yeger, H., & Cutz, E. (2016). Hyperplasia and hypertrophy of pulmonary neuroepithelial bodies, presumed airway hypoxia sensors, in hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-deficient mice. *Hypoxia*. <https://doi.org/10.2147/hp.s103957>
- Raval, R. R., Lau, K. W., Tran, M. G. B., Sowter, H. M., Mandriota, S. J., Li, J.-L., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Harris, A. L., & Ratcliffe, P. J. (2005). Contrasting Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.13.5675-5686.2005>
- Rifkind, R. A. (1965). Heinz body anemia: an ultrastructural study. II. Red cell sequestration and destruction. *Blood*, 26(4). <https://doi.org/10.1182/blood.v26.4.433.433>
- Ruzankina, Y., Pinzon-Guzman, C., Asare, A., Ong, T., Pontano, L., Cotsarelis, G., Zediak, V. P., Velez, M., Bhandoola, A., & Brown, E. J. (2007). Deletion of the Developmentally Essential Gene ATR in Adult Mice Leads to Age-Related Phenotypes and Stem Cell Loss. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.03.002>
- Ryan, H. E., Lo, J., & Johnson, R. S. (1998). HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.11.3005>
- Sakata, T., Ferdous, G., Tsuruta, T., Satoh, T., Baba, S., Muto, T., Ueno, A., Kanai, Y., Endou, H., & Okayasu, I. (2009). L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathology International*. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2008.02319.x>
- Sampedro-Núñez, M., Bouthelier, A., Serrano-Somavilla, A., Martínez-Hernández, R., Adrados, M., Martín-Pérez, E., de Nova, J. L. M., Cameselle-Teijeiro, J. M., Blanco-Carrera, C., Cabezas-Agricola, J. M., Díaz, J. Á., García-Centeno, R., Aragones, J., & Marazuela, M. (2020). Lat-1 and glut-1 carrier expression and its prognostic value in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers12102968>
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., & Sabatini, D. M. (2010). Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.024>
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2008). The rag GTPases bind raptor and mediate amino acid

- signaling to mTORC1. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1157535>
- Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A., & Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.003>
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., & Bannai, S. (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17). <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11455>
- Sawada, K., Krantz, S. B., Dai, C. -H, Koury, S. T., Horn, S. T., Glick, A. D., & Civin, C. I. (1990). Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041420202>
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Schietke, R. E., Hackenbeck, T., Tran, M., Günther, R., Klanke, B., Warnecke, C. L., Knaup, K. X., Shukla, D., Rosenberger, C., Koesters, R., Bachmann, S., Betz, P., Schley, G., Schödel, J., Willam, C., Winkler, T., Amann, K., Eckardt, K. U., Maxwell, P., & Wiesener, M. S. (2012). Renal tubular HIF-2 $\alpha$  expression requires VHL inactivation and causes fibrosis and cysts. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031034>
- Schödel, J., Mole, D. R., & Ratcliffe, P. J. (2013). Pan-genomic binding of hypoxia-inducible transcription factors. In *Biological Chemistry* (Vol. 394, Issue 4). <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0351>
- Schumann, T., König, J., Henke, C., Willmes, D. M., Bornstein, S. R., Jordan, J., Fromm, M. F., & Birkenfeld, A. L. (2020). Solute carrier transporters as potential targets for the treatment of metabolic disease. *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.118.015735>
- Scortegagna, M., Morris, M. A., Oktay, Y., Bennett, M., & Garcia, J. A. (2003). The HIF family member EPAS1/HIF-2 $\alpha$  is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-02-0448>
- Sekiguchi, T., Hirose, E., Nakashima, N., Ii, M., & Nishimoto, T. (2001). Novel G Proteins, Rag C and Rag D, Interact with GTP-binding Proteins, Rag A and Rag B. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004389200>
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
- Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M., & Wang, G. L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31580-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31580-6)
- Shah, Y. M., Matsubara, T., Ito, S., Yim, S. H., & Gonzalez, F. J. (2009). Intestinal Hypoxia-Inducible Transcription Factors Are Essential for Iron Absorption following Iron Deficiency. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.012>
- Shen, C., Beroukhim, R., Schumacher, S. E., Zhou, J., Chang, M., Signoretti, S., & Kaelin, W. G. (2011). Genetic and functional studies implicate HIF1a as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discovery*. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0098>
- Shih, H. M., Wu, C. J., & Lin, S. L. (2018). Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. In *Journal of the Formosan Medical Association*.



<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.03.017>

Shinojima, T., Oya, M., Takayanagi, A., Mizuno, R., Shimizu, N., & Murai, M. (2007). Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2 $\alpha$ . *Carcinogenesis*, 28(3). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl143>

Sinclair, L. V., Rolf, J., Emslie, E., Shi, Y. B., Taylor, P. M., & Cantrell, D. A. (2013). Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.2556>

Singh, N., & Ecker, G. F. (2018). Insights into the structure, function, and ligand discovery of the large neutral amino acid transporter 1, lat1. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/ijms19051278>

Smith, K., Gunaratnam, L., Morley, M., Franovic, A., Mekhail, K., & Lee, S. (2005). Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0169>

Smythies, J. A., Sun, M., Masson, N., Salama, R., Simpson, P. D., Murray, E., Neumann, V., Cockman, M. E., Choudhry, H., Ratcliffe, P. J., & Mole, D. R. (2019). Inherent DNA -binding specificities of the HIF -1 $\alpha$  and HIF -2 $\alpha$  transcription factors in chromatin . *EMBO Reports*. <https://doi.org/10.15252/embr.201846401>

Socolovsky, M. (2007). Molecular insights into stress erythropoiesis. In *Current Opinion in Hematology*. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3280de2bf1>

Stephenson, J. R., Axelrad, A. A., McLeod, D. L., & Shreeve, M. M. (1971). Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.7.1542>

Tacchini, L., Bianchi, L., Bernelli-Zazzera, A., & Cairo, G. (1999). Transferrin Receptor Induction by Hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.24142>

Tărlungeanu, D. C., Deliu, E., Dotter, C. P., Kara, M., Janiesch, P. C., Scalise, M., Galluccio, M., Tesulov, M., Morelli, E., Sonmez, F. M., Bilguvar, K., Ohgaki, R., Kanai, Y., Johansen, A., Esharif, S., Ben-Omran, T., Topcu, M., Schlessinger, A., Indiveri, C., ... Novarino, G. (2016). Impaired Amino Acid Transport at the Blood Brain Barrier Is a Cause of Autism Spectrum Disorder. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.013>

Tauzin, L., Campos, V., & Tichet, M. (2018). Cellular endogenous NAD(P)H fluorescence as a label-free method for the identification of erythrocytes and reticulocytes. *Cytometry Part A*, 93(4). <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23351>

Tavian, M., & Péault, B. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. In *International Journal of Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041957mt>

Taylor, M., Qu, A., Anderson, E. R., Matsubara, T., Martin, A., Gonzalez, F. J., & Shah, Y. M. (2011). Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.03.007>

Tian, H., McKnight, S. L., & Russell, D. W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.11.1.72>

- To, K. K. W., Sedelnikova, O. A., Samons, M., Bonner, W. M., & Huang, L. E. (2006). The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1 $\alpha$  from HIF-2 $\alpha$  in NBS1 repression. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601369>
- Tomblin, J. K., Arthur, S., Primerano, D. A., Chaudhry, A. R., Fan, J., Denvir, J., & Salisbury, T. B. (2016). Aryl hydrocarbon receptor (AHR) regulation of L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT-1) expression in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.02.020>
- Torrents, D., Estévez, R., Pineda, M., Fernández, E., Lloberas, J., Shi, Y. B., Zorzano, A., & Palacín, M. (1998). Identification and characterization of a membrane protein (y+L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y+L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49). <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32437>
- Torres-Capelli, M., Marsboom, G., Li, Q. O. Y., Tello, D., Rodriguez, F. M., Alonso, T., Sanchez-Madrid, F., Garcia-Rio, F., Ancochea, J., & Aragones, J. (2016). Role of Hif2 $\alpha$  Oxygen Sensing Pathway in Bronchial Epithelial Club Cell Proliferation. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep25357>
- Uoshima, N., Ozawa, M., Kimura, S., Tanaka, K., Wada, K., Kobayashi, Y., & Kondo, M. (1995). Changes in c-Kit expression and effects of SCF during differentiation of human erythroid progenitor cells. *British Journal of Haematology*, 91(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb05240.x>
- Urrutia, A. A., Guan, N., Mesa-Ciller, C., Afzal, A., Davidoff, O., & Haase, V. H. (2021). Inactivation of HIF-prolyl 4-hydroxylases 1, 2 and 3 in NG2-expressing cells induces HIF2-mediated neurovascular expansion independent of erythropoietin. *Acta Physiologica*. <https://doi.org/10.1111/apha.13547>
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>
- Wang, Q., Bailey, C. G., Ng, C., Tiffen, J., Thoeng, A., Minhas, V., Lehman, M. L., Hendy, S. C., Buchanan, G., Nelson, C. C., Rasko, J. E. J., & Holst, J. (2011). Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1821>
- Wang, Q., Tiffen, J., Bailey, C. G., Lehman, M. L., Ritchie, W., Fazli, L., Metierre, C., Feng, Y. J., Li, E., Gleave, M., Buchanan, G., Nelson, C. C., Rasko, J. E. J., & Holst, J. (2013). Targeting amino acid transport in metastatic castration-resistant prostate cancer: Effects on cell cycle, cell growth, and tumor development. *Journal of the National Cancer Institute*. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt241>
- Wang, S., Tsun, Z. Y., Wolfson, R. L., Shen, K., Wyant, G. A., Plovanich, M. E., Yuan, E. D., Jones, T. D., Chantranupong, L., Comb, W., Wang, T., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Straub, C., Kim, C., Park, J., Sabatini, B. L., & Sabatini, D. M. (2015). Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1257132>
- Ward, J. P. T. (2008). Oxygen sensors in context. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.10.010>
- Warnecke, C., Zaborowska, Z., Kurreck, J., Erdmann, V. A., Frei, U., Wiesener, M., & Eckardt, K. (2004). Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 $\alpha$

- target gene in Hep3B and Kelly cells. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1640fje>
- Weitz-Hamburger, A., Fredrickson, T. N., LoBue, J., Hardy, W. D., Camiscoli, J. F., Ferdinand, P., Gallicchio, V., & Gordon, A. S. (1975). Stimulation of erythropoietic differentiation in BALB/c mice infected with Rauscher leukemia virus. *Journal of the National Cancer Institute*. <https://doi.org/10.1093/jnci/55.5.1171>
- Wenninger, J., Meinitzer, A., Holasek, S., Schnedl, W. J., Zelzer, S., Mangge, H., Herrmann, M., & Enko, D. (2019). Associations between tryptophan and iron metabolism observed in individuals with and without iron deficiency. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51215-8>
- Wiesener, M. S., Jürgensen, J. S., Rosenberger, C., Scholze, C. K., Hörstrup, J. H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U. A., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Bachmann, S., Maxwell, P. H., & Eckardt, K. U. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(2). <https://doi.org/10.1096/fj.02-0445fje>
- Wu, D. C., & Paulson, R. F. (2010). Hypoxia regulates BMP4 expression in the murine spleen during the recovery from acute anemia. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011303>
- Wu, H., Klingmüller, U., Besmer, P., & Lodish, H. F. (1995). Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/377242a0>
- Wu, P., Zhang, N., Wang, X., Zhang, C., Li, T., Ning, X., & Gong, K. (2012). The Erythropoietin/Erythropoietin Receptor Signaling Pathway Promotes Growth and Invasion Abilities in Human Renal Carcinoma Cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045122>
- Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y., & Gouaux, E. (2005). Crystal structure of a bacterial homologue of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03978>
- Yamashita, T., Ohneda, O., Sakiyama, A., Iwata, F., Ohneda, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (2008). The microenvironment for erythropoiesis is regulated by HIF-2 $\alpha$  through VCAM-1 in endothelial cells. *Blood*, 112(4). <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-122648>
- Yan, Q., Bartz, S., Mao, M., Li, L., & Kaelin, W. G. (2007). The Hypoxia-Inducible Factor 2 $\alpha$  N-Terminal and C-Terminal Transactivation Domains Cooperate To Promote Renal Tumorigenesis In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.01514-06>
- Yoo, H. C., Park, S. J., Nam, M., Kang, J., Kim, K., Yeo, J. H., Kim, J.-K., Heo, Y., Lee, H. S., Lee, M. Y., Lee, C. W., Kang, J. S., Kim, Y.-H., Lee, J., Choi, J., Hwang, G.-S., Bang, S., & Han, J. M. (2019). A Variant of SLC1A5 Is a Mitochondrial Glutamine Transporter for Metabolic Reprogramming in Cancer Cells. *Cell Metabolism*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.020>
- Yu, Z., Lin, W., Rui, Z., & Jihong, P. (2018). Fibroblast-like synoviocyte migration is enhanced by IL-17-mediated overexpression of I-type amino acid transporter 1 (LAT1) via the mTOR/4E-BP1 pathway. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2520-4>
- Yue, M., Jiang, J., Gao, P., Liu, H., & Qing, G. (2017). Oncogenic MYC Activates a Feedforward Regulatory Loop Promoting Essential Amino Acid Metabolism and Tumorigenesis. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.002>



Zhang, B., Chen, Y., Shi, X., Zhou, M., Bao, L., Hatanpaa, K. J., Patel, T., DeBerardinis, R. J., Wang, Y., & Luo, W. (2020). Regulation of branched-chain amino acid metabolism by hypoxia-inducible factor in glioblastoma. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03483-1>

Zhang, T., Niu, X., Liao, L., Cho, E. A., & Yang, H. (2013). The contributions of HIF-target genes to tumor growth in RCC. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080544>

Zivot, A., Lipton, J. M., Narla, A., & Blanc, L. (2018). Erythropoiesis: Insights into pathophysiology and treatments in 2017. In *Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0011-z>

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., & Sabatini, D. M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1207056>

# ANEXO I

La PARTE I presentada en este trabajo se haya fundamentalmente descrita en el siguiente artículo:

**Bouthelier, A.**, Meléndez-Rodríguez, F., Urrutia, A. A., & Aragonés, J. (2020). Differential contribution of n-and c-terminal regions of hif1 $\alpha$  and hif2 $\alpha$  to their target gene selectivity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249401>

Durante su periodo de formación el doctorando ha participado, además, en los siguientes trabajos:

- Sampedro-Núñez, M., **Bouthelier, A.**, Serrano-Somavilla, A., Martínez-Hernández, R., Adrados, M., Martín-Pérez, E., de Nova, J. L. M., Cameselle-Teijeiro, J. M., Blanco-Carrera, C., Cabezas-Agricola, J. M., Díaz, J. Á., García-Centeno, R., Aragonés, J., & Marazuela, M. (2020). Lat-1 and glut-1 carrier expression and its prognostic value in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers12102968>
- **Bouthelier, A.**, Meléndez-Rodríguez, F., Urrutia, A. A., & Aragonés, J. (2020). Differential contribution of n-and c-terminal regions of hif1 $\alpha$  and hif2 $\alpha$  to their target gene selectivity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249401>
- Meléndez-Rodríguez, F., Urrutia, A. A., Lorendeau, D., Rinaldi, G., Roche, O., Böğürçü-Seidel, N., Ortega Muelas, M., Mesa-Ciller, C., Turiel, G., **Bouthelier, A.**, Hernansanz-Agustín, P., Elorza, A., Escasany, E., Li, Q. O. Y., Torres-Capelli, M., Tello, D., Fuertes, E., Fraga, E., Martínez-Ruiz, A., ... Aragonés, J. (2019). HIF1 $\alpha$  Suppresses Tumor Cell Proliferation through Inhibition of Aspartate Biosynthesis. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.106>

# **ANEXO II**



Article

# Differential Contribution of N- and C-Terminal Regions of HIF1 $\alpha$ and HIF2 $\alpha$ to Their Target Gene Selectivity

Antonio Bouthelier<sup>1</sup>, Florinda Meléndez-Rodríguez<sup>1</sup> , Andrés A. Urrutia<sup>1,\*</sup> and Julián Aragonés<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Research Unit, Hospital Santa Cristina, Research Institute Princesa (IP), Autonomous University of Madrid, 28009 Madrid, Spain; antonio.bouthelier@estudiante.uam.es (A.B.); fcmelrod@gmail.com (F.M.-R.)

<sup>2</sup> CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, Carlos III Health Institute, 28029 Madrid, Spain

\* Correspondence: andres.urrutia@uam.es (A.A.U.); julian.aragones@uam.es (J.A.)

Received: 5 October 2020; Accepted: 7 December 2020; Published: 10 December 2020



**Abstract:** Cellular response to hypoxia is controlled by the hypoxia-inducible transcription factors HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ . Some genes are preferentially induced by HIF1 $\alpha$  or HIF2 $\alpha$ , as has been explored in some cell models and for particular sets of genes. Here we have extended this analysis to other HIF-dependent genes using in vitro WT8 renal carcinoma cells and in vivo conditional *Vhl*-deficient mice models. Moreover, we generated chimeric HIF1/2 transcription factors to study the contribution of the HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  DNA binding/heterodimerization and transactivation domains to HIF target specificity. We show that the induction of HIF1 $\alpha$ -dependent genes in WT8 cells, such as *CAIX* (*CAR9*) and *BNIP3*, requires both halves of HIF, whereas the HIF2 $\alpha$  transactivation domain is more relevant for the induction of HIF2 target genes like the amino acid carrier *SLC7A5*. The HIF selectivity for some genes in WT8 cells is conserved in *Vhl*-deficient lung and liver tissue, whereas other genes like *Glut1* (*Slc2a1*) behave distinctly in these tissues. Therefore the relative contribution of the DNA binding/heterodimerization and transactivation domains for HIF target selectivity can be different when comparing HIF1 $\alpha$  or HIF2 $\alpha$  isoforms, and that HIF target gene specificity is conserved in human and mouse cells for some of the genes analyzed.

**Keywords:** oxygen; hypoxia-inducible factors; HIF1; HIF2; transcription

## 1. Introduction

In different pathological scenarios such as tumor growth, cardiac ischemia or lung diseases there are insufficiencies in the oxygen supply, a situation that also arises in physiological circumstances like embryonic development. Hypoxia-inducible factors (HIFs) are central to the biological tolerance of hypoxia. HIFs are heterodimeric transcription factors composed of one alpha subunit (HIF $\alpha$ ) and one beta subunit (HIF $\beta$ ), the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) [1,2]. While the HIF $\beta$  subunit is stable, the stability of the HIF $\alpha$  subunits is controlled by the prolyl-4-hydroxylase (PHD) domain proteins (PHD1, PHD2 and PHD3), 2-oxoglutarate dependent Fe<sup>2+</sup>-dioxygenases [3,4]. In normoxia, PHDs use oxygen to hydroxylate two conserved proline residues in the HIF $\alpha$  subunits, and these hydroxylated prolyl residues are recognized by the VHL/E3 ubiquitin ligase complex, which targets the HIF $\alpha$  subunits for proteasome degradation [5,6]. Conversely, in hypoxic conditions PHDs do not have enough oxygen to hydroxylate the HIF $\alpha$  subunits, preventing their recognition by VHL/E3 and resulting in their stabilization. Stable HIF $\alpha$  subunits can shuttle to the nucleus, where they can heterodimerize with HIF $\beta$  subunits and bind to DNA at the hypoxia response elements (HREs) of target genes, thereby driving a HIF-dependent transcriptional program [7–9].

The HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  subunits are those that have been studied most intensely, and that have been seen to be involved in numerous cellular responses to hypoxia like angiogenesis, erythropoiesis or

metabolic reprogramming [10,11]. Some of the genes induced by HIF can be induced equally by both isoforms, whereas others are preferentially or exclusively controlled by the HIF1 $\alpha$  or HIF2 $\alpha$  isoform. Indeed, genes encoding glycolytic enzymes are exclusively controlled by HIF1 $\alpha$  in different cellular models, which is consistent with the HIF1 $\alpha$  isoform participating in the anaerobic metabolic switch executed by hypoxic cells [12–15]. In sharp contrast, expression of the hypoxia-dependent erythropoietin (*EPO*) gene in kidney tissue is controlled exclusively by the HIF2 $\alpha$  isoform [16], reflecting the central role of HIF2 $\alpha$  in erythropoiesis. Indeed, *EPO* production is controlled by HIF2 $\alpha$  in scenarios other than the kidney, such as in hepatocytes, astrocytes and pericytes [17–19]. Moreover, HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  appear to be involved in opposing biological actions, in line with the target genes specifically controlled by each isoform. Thus, HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  have contrasting properties in human clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), which is characterized by the loss of *VHL* and the ensuing constitutive stabilization of HIF in normoxic conditions. In this context HIF1 $\alpha$  can repress tumor cell proliferation in different biological settings [20–23], including that of ccRCC, while HIF2 $\alpha$  favors the proliferation of *VHL*-deficient RCCs and tumor formation [24–26]. These contrasting responses were first related to the distinct effects of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms on c-Myc activity [24,25]. Moreover other genes have since been shown to be preferentially induced by HIF1 $\alpha$  in *VHL*-deficient renal tumor cells, including *carbonic anhydrase IX* (*CAR9*, from here on referred to as *CAIX*) and *BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3* (*BNIP3*) [27]. Unlike, some other genes involved in renal cancer proliferation, such as *cyclin D1* (*CCND1*), *transforming growth factor alpha* (*TGFA*) and the amino acid carrier *SLC7A5* are preferentially induced by HIF2 $\alpha$ . Thus, these latter genes have been associated with the oncoprotein potential of the HIF2 $\alpha$  isoform in *VHL*-deficient RCC [27–29].

HIF1 $\alpha$  or HIF2 $\alpha$  isoforms show a high degree of amino acid similarity in their N-terminal half, the region containing the basic helix-loop-helix (bHLH) domain involved in DNA binding and the Per-Arnt-Sim (PAS) domain that is responsible for heterodimerization with the HIF1 $\beta$  subunit [13,30]. Weaker similarity is found in the C-terminal region of these HIF proteins where their N-terminal transactivation domain (NTAD) and C-terminal transactivation domain (CTAD) transactivation domains are located [13,30]. The specificity of HIF1 for genes like *phosphoglycerate kinase 1* (*PGK-1*) has been attributed to its NTAD region in HEK293 and Hep3B cells [13]. However, both the bHLH-PAS and NTAD/CTAD regions have been shown to be necessary for other HIF1 $\alpha$ -dependent genes like *CAIX* in 786-O RCC cells [31,32]. Regarding HIF2 $\alpha$ , its NTAD/CTAD region is involved in the HIF2 $\alpha$ -dependent induction of the *plasminogen activator inhibitor-1* (*SERPINE1*) and *Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2* (*CITED2*) in some cell lines, such as Hep3B [13], as well as that of *PHD3* in the 786-O cell line [31]. HIF target gene specificity has been largely studied in in vitro cellular models [12,13,27,31,33–35]. Moreover, the target specificity of HIF1 and HIF2 in biological settings has been less well explored in vivo [17,36]. In addition, the relative contribution of the bHLH-PAS and NTAD/CTAD halves of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  to target gene selectivity has been studied for particular sets of genes. Here we have extended the analysis to some other HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ -dependent genes in an in vitro cell model of human renal cell carcinoma as well as in mice with *Vhl* gene inactivation in which HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms are constitutively activated. Moreover, we have evaluated the relative contribution of the bHLH/PAS and the NTAD/CTAD transactivation halves to confer HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ -target selectivity for some genes that have not been included in previous studies. We found that both HIF1 $\alpha$  bHLH/PAS and NTAD/CTAD halves can be necessary to induce some HIF1 $\alpha$ -dependent genes while the HIF2 $\alpha$  NTAD/CTAD half is more relevant to confer HIF2 target selectivity. Finally we found that the target selectivity showed by most of the genes preferentially induced by HIF2 $\alpha$  in human renal cell carcinoma is controlled by HIF2 $\alpha$  in the liver, the lung and the kidney of *Vhl*-deficient mice, suggesting that HIF target specificity has been conserved in some extent between mouse and human cells.

## 2. Results

### 2.1. Target Gene Selectivity of HIF1 $\alpha$ and HIF2 $\alpha$ in WT8 Cells

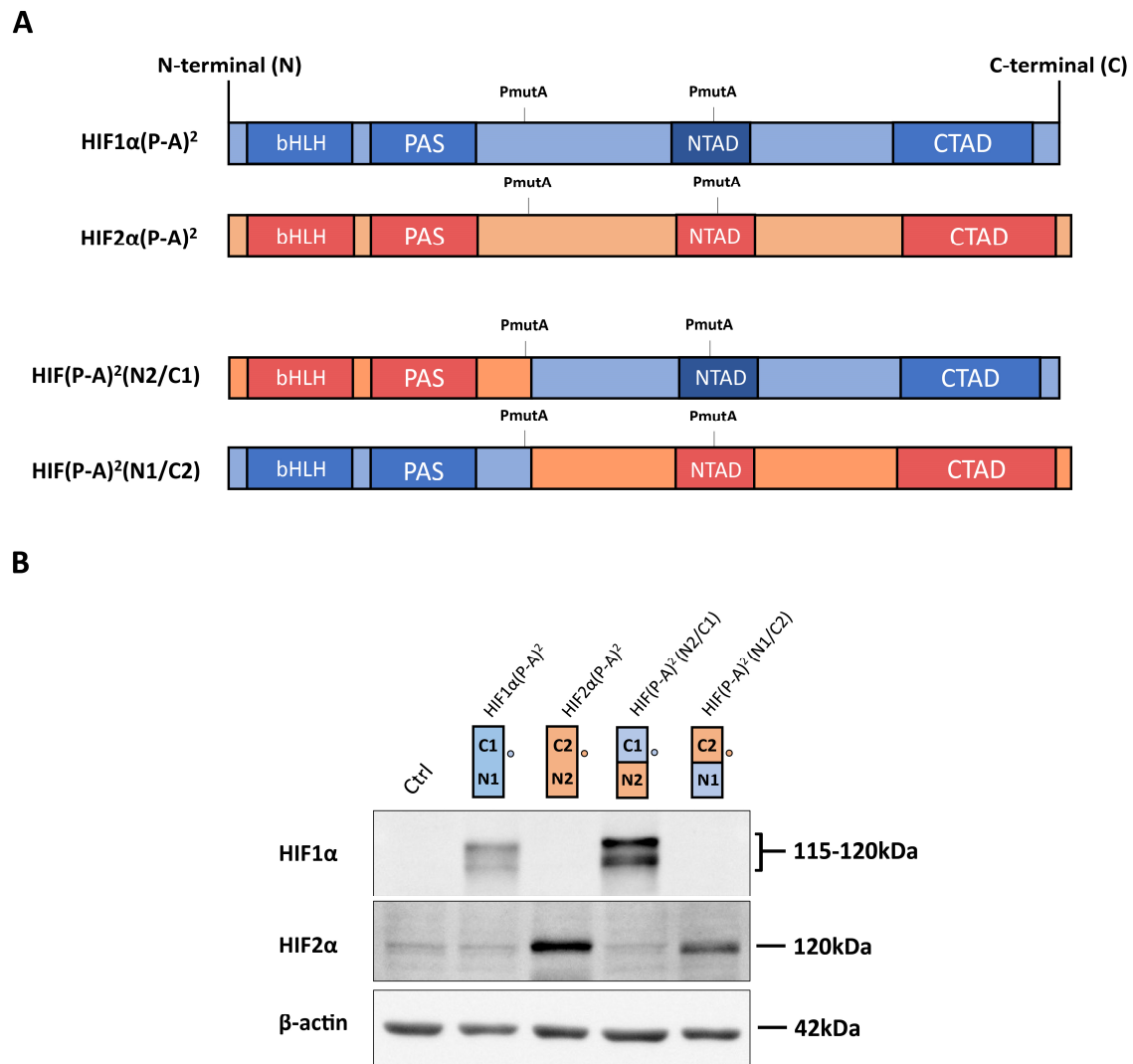
The *VHL*-deficient ccRCC cells represent a model in which genes preferentially induced by HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  have been identified, and where both HIF isoforms are constitutively active in normoxic conditions. To study the distinct transcriptional responses provoked by HIF1 $\alpha$  or HIF2 $\alpha$  in renal cell carcinoma (RCC), we used WT8 cells that were generated by restoration of *VHL* expression into the 786-O *VHL* deficient RCC cell line [26]. The specific transcriptional effect of the HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms can be investigated in this cell model by expressing constitutively active HIF1 $\alpha$  or HIF2 $\alpha$  constructs HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> or HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, which lack the critical proline residues for VHL recognition (Figure 1A,B). As such, the expression of *CAIX*, *BNIP3* and *phosphoglycerate mutase-1* (*PGM1*) was elevated exclusively in HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> WT8 cells but not in HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> WT8 cells relative to the control cells (Figure 2A), in line with previous studies showing that these genes are induced by HIF1 $\alpha$  in ccRCC cells [27,31,37,38]. By contrast, the expression of other HIF-dependent genes like *PHD3*, *CCND1*, *solute carrier family 2 member 1* (*SLC2A1* or *GLUT-1*), *TGFA*, *POU domain class 5 transcription factor 1* (*POU5F1* or *OCT-4*) and *N-myc downstream regulated gene 1* (*NDRG1*) was preferentially elevated in HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> WT8 cells (Figure 2B), again in line with previous studies showing the participation of HIF2 $\alpha$  in the gene expression of these genes [27,29,31,39,40].

As described above, there is higher amino acid similarity in the half of the HIF $\alpha$  isoforms involved in DNA binding and heterodimerization, containing the bHLH and PAS domains, than in that which contains their NTAD and CTAD domains (Figure 1A). Therefore, we set out to assess the relative contribution of the bHLH-PAS region as opposed to that of the NTAD/CTAD transactivation region of the HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms to their target gene selectivity in WT8 cells. As such, we generated a HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) chimera that contained the HIF1 $\alpha$  bHLH-PAS N-terminal region (residues 1 to 411 of HIF1 $\alpha$ ) fused to the HIF2 $\alpha$  C-terminal stabilization/transactivation region (residues 415 to 870 of HIF2 $\alpha$ ) (Figure 1A). Similarly, we also generated the HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) chimera comprised of the HIF2 $\alpha$  bHLH-PAS N-terminal region (residues 1 to 414 of HIF2 $\alpha$ ) fused to the HIF1 $\alpha$  C-terminal stabilization/transactivation region (residues 412 to 826 of HIF1 $\alpha$ ) (Figure 1A). Like HIF1(P-A)<sup>2</sup> and HIF2(P-A)<sup>2</sup>, these chimeras also lack the key proline residues for VHL recognition and therefore they are constitutively expressed in WT8 cells under normoxic conditions. Indeed, HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) and HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) chimeras were also efficiently expressed in normoxic WT8 cells (Figure 1B). The expression of *CAIX*, *BNIP3* and *PGM1* was not elevated in either HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) WT8 cells or HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) WT8 cells (Figure 2A). Hence, these data suggest that the HIF1(P-A)<sup>2</sup>-dependent induction of *CAIX*, *BNIP3* and *PGM1* expression requires the integrity of both the bHLH-PAS and the transactivation NTAD/CTAD HIF1 $\alpha$  region (Figure 2A).

In terms of the HIF2-dependent genes, we first found that the HIF (P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) chimera did not induce or produced a modest elevation in the expression of the HIF2-dependent genes analyzed. In contrast *PHD3* expression was induced by the HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) chimera to a greater extent than by HIF2(P-A)<sup>2</sup> (Figure 2B). Moreover HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) also induced *CCND1*, *GLUT1*, *TGFA*, *NDRG1* and *OCT-4* expression but only partially when compared with HIF2(P-A)<sup>2</sup> especially *OCT-4* and *NDRG1* (Figure 2B). Notably, the HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) chimeric protein was routinely expressed more weakly than HIF2(P-A)<sup>2</sup> (Figure 1B), which might also explain the partial induction of *CCND1*, *GLUT-1*, *TGFA*, *NDRG1* and *OCT-4* gene expression by this HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) chimera (see discussion). These data suggest that the NTAD/CTAD transactivation region of HIF2 $\alpha$  plays a role in the gene expression specifically induced by HIF2, especially in the case of *PHD3* for which HIF2 $\alpha$  selectivity could be fully attributed to this C-terminal region of HIF2 $\alpha$  in WT8 cells. Moreover, these data also suggest that the relative contribution of the NTAD/CTAD transactivation region of HIF2 $\alpha$  might be different in each HIF2 $\alpha$ -dependent gene.



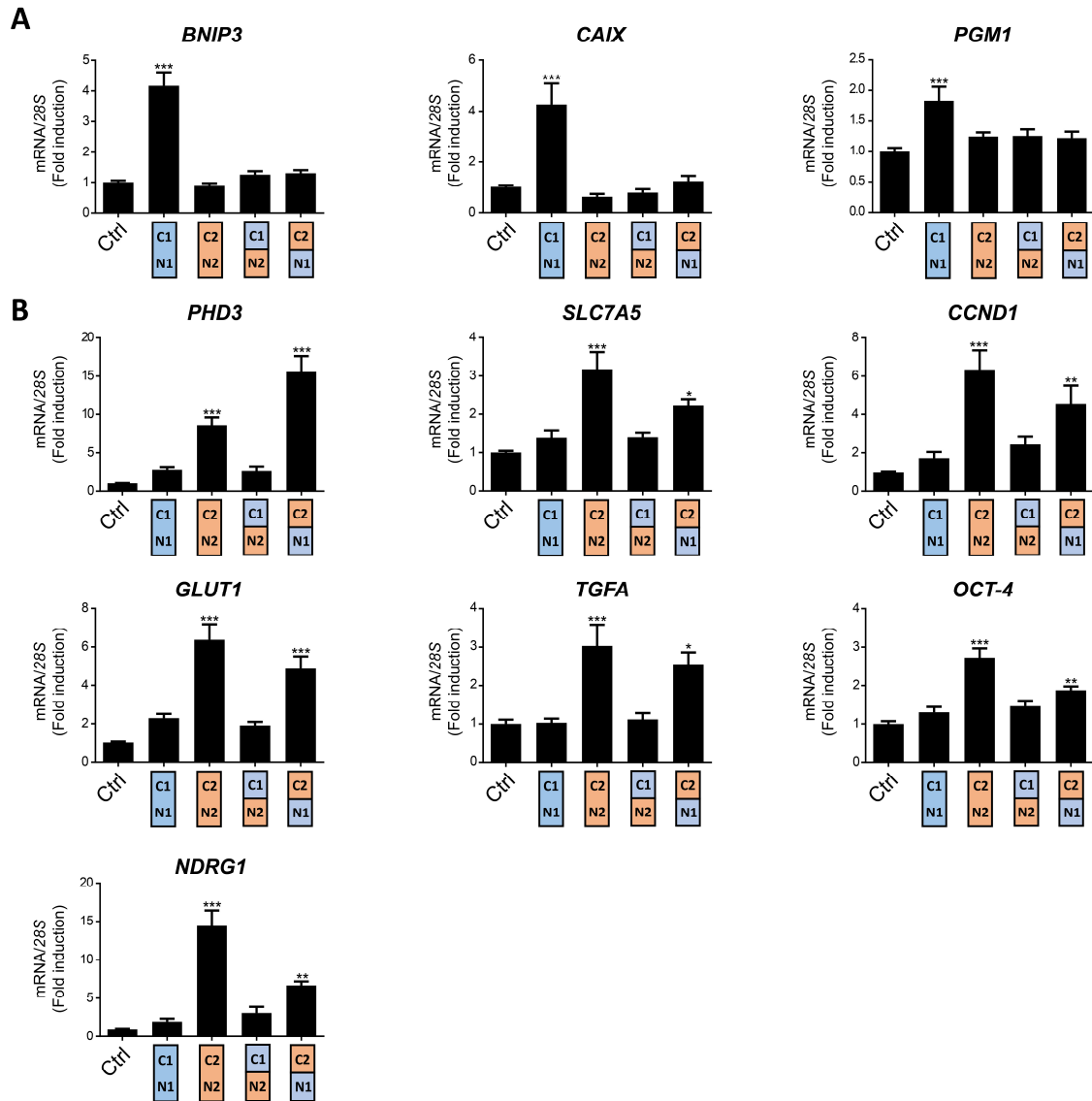
dependent genes like *PHD3*, *CCND1*, *solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1 or GLUT-1)*, *TGFA*, *POU domain class 5 transcription factor 1 (POU5F1 or OCT-4)* and *N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)* was preferentially elevated in HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> WT8 cells (Figure 2B), again in line with previous studies, showing the participation of HIF2 $\alpha$  in the gene expression of these genes [27,29,31,39,40].



**Figure 1.** Expression of hypoxia-inducible transcription factor (HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> and the HIF(P-A)<sup>2</sup>(N2/C1)/HIF(P-A)<sup>2</sup>(N1/C2) chimeric versions in WT8 cells (A) (A) Schematic of the HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> (in blue) and HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> (in red), as well as the HIF1 $\alpha$ /HIF2 $\alpha$  chimeric constructs. The HIF(P-A)<sup>2</sup>(N2/C1) construct contains residues 1–414 of HIF2 $\alpha$ , including the HIF2 $\alpha$  basic helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS) domain, and residues 412–826 of HIF1 $\alpha$  that includes the HIF1 $\alpha$  N-terminal transactivation domain/N-terminal transactivation domain (NTAD/CTAD) transactivation domains. The HIF(P-A)<sup>2</sup>(N1/C2) construct contains amino acids 1–411 of HIF1 $\alpha$ , including the HIF1 $\alpha$  bHLH-PAS domain, and amino acids 415–870 of HIF2 $\alpha$  that includes the HIF2 $\alpha$  NTAD/CTAD transactivation domain; (B) representative Western blots probed for the HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  and  $\beta$ -actin proteins in control WT8 cells, and those expressing the HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> and the HIF(P-A)<sup>2</sup>(N2/C1) or HIF(P-A)<sup>2</sup>(N1/C2) chimeric constructs. Circle indicates the HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  half where the antibodies against HIF1 $\alpha$  or anti-HIF2 $\alpha$  recognize. Estimated molecular weights of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  (based on molecular weights markers included in the Western blot analysis) are included.

Collectively these data suggest that selective HIF1-dependent induction of *CAIX*, *BNIP3* and *PGM1* in WT8 cells requires the presence of both the bHLH-PAS and transactivation NTAD/CTAD regions of HIF1 $\alpha$ , while the transactivation NTAD/CTAD region of HIF2 $\alpha$  seem to be more relevant than the bHLH-PAS region to explain the preferential induction of *PHD3*, *CCND1*, *GLUT-1*, *TGFA*, *OCT-4* and *NDRG1* by HIF2 $\alpha$ .

NTAD/CTAD transactivation domain; (B) representative Western blots probed for the HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  and  $\beta$ -actin proteins in control WT8 cells, and those expressing the HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> and the HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) or HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) chimeric constructs. Circle indicates the HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  half where the antibodies against HIF1 $\alpha$  or anti-HIF2 $\alpha$  recognize. Estimated molecular weights of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  (based on molecular weights markers included in the Western blot analysis) are included.



**Figure 2.** Target gene specificity for HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> and the HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) or HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) chimeric versions in WT8 cells. (A) Relative *BNIP3*, *CAIX* and *PGM1* gene expression in control WT8 cells and those expressing the HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup>, HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> and the HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) or HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) chimeric constructs. (B) Relative *PHD3*, *OCT4*, *NDRG1*, *TGFA* and *SLC7A5* expression in WT8 cells (n=6) and those expressing the HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> (n=6), HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> and the HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) (n=6) or HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) (n=6) chimeric constructs. Data are shown as SEM. Statistical analysis SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001. Significance with control group is indicated.

### 2.2. The Role of the HIF2 $\alpha$ NTAD/CTAD Transactivation Region in the Expression of the SLC7A5 Amino Acid Carrier

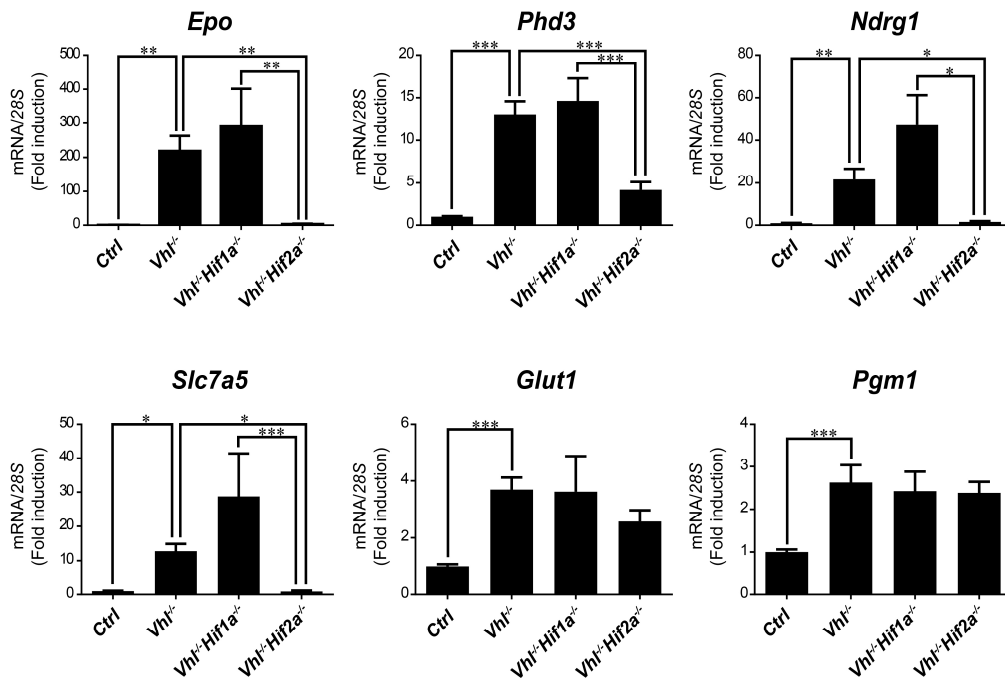
As described above, there is higher amino acid similarity in the half of the HIF $\alpha$  isoforms involved in DNA binding and heterodimerization, containing the bHLH and PAS domains, than in that which contains their NTAD and CTAD domains (Figure 1A). Therefore, we set out to assess the activity of HIF2 $\alpha$  in these tumor cells [28]. Moreover, increased SLC7A5 expression has been found in VHL-deficient human ccRCC samples relative to a healthy kidney [28,41,42]. In line with our previous studies, the expression of *SLC7A5* mRNA was preferentially induced in HIF2 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> WT8 cells when compared to HIF1 $\alpha$ (P-A)<sup>2</sup> and control WT8 cells (Figure 2B). Thus, we wondered about the relative contribution of the HIF2 $\alpha$  bHLH/PAS and NTAD/CTAD domains to HIF2 $\alpha$ -dependent *SLC7A5*

expression. We found that the HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) chimera partially induced *SLC7A5* gene expression, while HIF(P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) did not show any significant effect on *SLC7A5* expression relative to HIF2(P-A)<sup>2</sup> in WT8 cells (Figure 2B). Therefore, the NTAD/CTAD HIF2 $\alpha$  region appeared to be more relevant to explain the preferential *SLC7A5* expression driven by the HIF2 $\alpha$  isoform, which is similar to the data obtained for the *CCND1*, *GLUT-1*, *TGFA*, *OCT-4* and *NDRG1* genes (Figure 2B). However, and as mentioned above, it should be noted that the expression of the HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) chimera was weaker than that of HIF2(P-A)<sup>2</sup> (Figure 1B), which might also explain why HIF(P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) might be less potent as HIF2(P-A)<sup>2</sup> to induce *SLC7A5*.

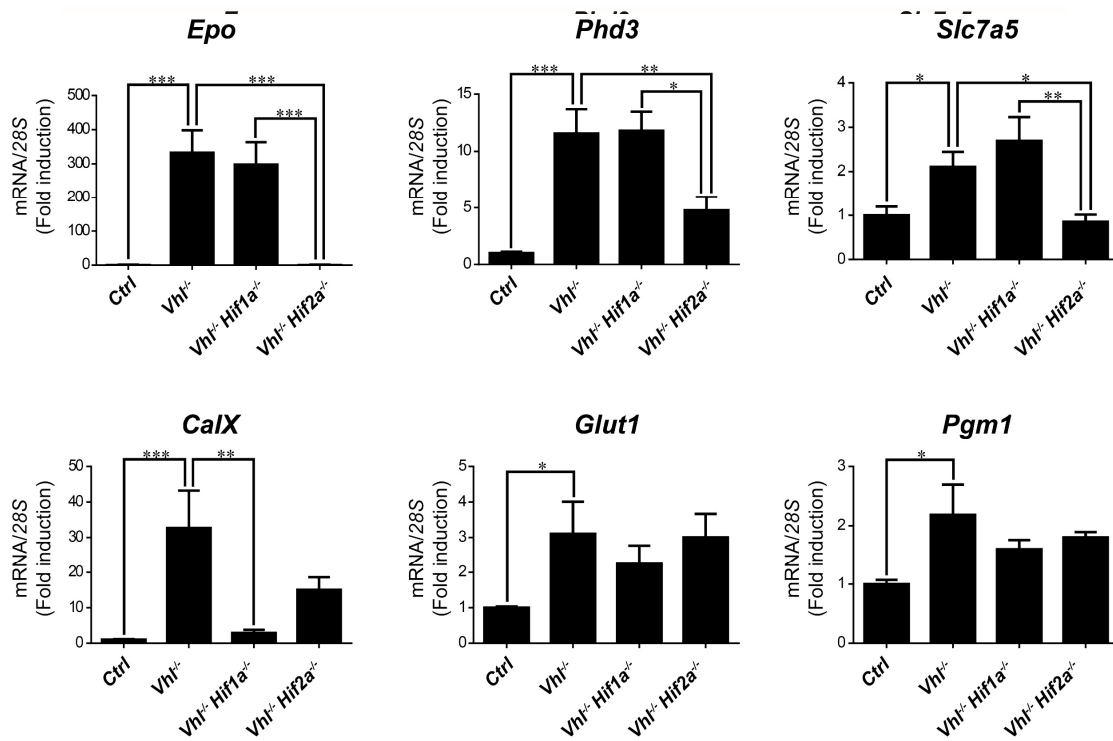
### 2.3. HIF1 $\alpha$ and HIF2 $\alpha$ Selectivity in *Vhl*-Deficient Tissues

We then asked whether HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  selectivity in WT8 RCC cells was also conserved in vivo upon HIF activation in mouse tissues. To this end, we generated adult *UBC-Cre-ERT2 Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup>*-mice (here on are referred to as *Vhl*<sup>-/-</sup>), in which the expression of *Vhl* can be acutely inactivated globally (Supplementary Figure S1), leading to constitutive HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  activation [28,43]. In addition, we also generated *Vhl*<sup>-/-Hif1a</sup><sup>-/-</sup> and *Vhl*<sup>-/-Hif2a</sup><sup>-/-</sup> mice in which *Vhl* and *Hif1a* or *Hif2a* can be inactivated simultaneously, allowing us to investigate the potential target gene specificity for either HIF isoform (Supplementary Figure S1). As a positive control we first analyzed erythropoietin (*Epo*) mRNA levels in liver and kidney tissue. In line with previous studies *Epo* and mRNA levels are markedly induced in *Vhl*<sup>-/-</sup> liver (Figure 3) and kidney (Figure 4) through HIF2 $\alpha$  isoform [17,44–46]. We also found that the expression of *Phd3* was induced consistently in the liver, kidney and lung of both *Vhl*<sup>-/-</sup> and *Vhl*<sup>-/-Hif1a</sup><sup>-/-</sup> mice (Figures 3–5), indicating that the induction of *Phd3* in vivo was not driven by the HIF1 $\alpha$  isoform in these three tissues (Figures 3–5). However, elevated expression of *Phd3* was markedly reduced in *Vhl*<sup>-/-Hif2a</sup><sup>-/-</sup> mice (Figures 3–5), indicating that the HIF-dependent expression of *Phd3* in the liver, kidney and lung was driven by the HIF2 $\alpha$  isoform, as in WT8 cells. In line with our previous study [28], we also found that *Slc7a5* expression was preferentially induced by the HIF2 $\alpha$  isoform in the liver, kidney and lung of *Vhl*<sup>-/-</sup> mice (Figures 3–5), as observed in WT8 cells. However, it should be noted that the increase in *Slc7a5* expression in the kidney tissue takes place to a lesser extent when compared with the liver and lung tissue (Figures 3–5). Moreover, *Tgfa* expression was only induced in the lung tissue of *Vhl*<sup>-/-</sup> mice preferentially by the HIF2 $\alpha$  isoform (Figure 5). Furthermore, *Ndr1* expression was markedly induced in the *Vhl*<sup>-/-</sup> liver and lung tissue through the HIF2 $\alpha$  isoform (Figures 3 and 5). Therefore, *Tgfa* and *Ndr1* displayed a similar HIF2 $\alpha$  specificity in these tissues as in renal cell carcinoma WT8 cells but not induced in the *Vhl*-deficient kidney tissue (see discussion). In contrast, *CalX* expression was markedly in *Vhl*<sup>-/-</sup> kidney tissue and reduced to a larger extent in the kidney tissue of *Vhl*<sup>-/-Hif1a</sup><sup>-/-</sup> than *Vhl*<sup>-/-Hif2a</sup><sup>-/-</sup> mice (Figure 4). These data suggest that *CalX* expression is largely controlled by HIF1 $\alpha$  in line with data obtained in WT8 cells. Furthermore, while *Glut1* expression was induced in the liver, kidney and lung of *Vhl*<sup>-/-</sup> mice, its expression was not significantly reduced in both *Vhl*<sup>-/-Hif2a</sup><sup>-/-</sup> and *Vhl*<sup>-/-Hif1a</sup><sup>-/-</sup> mice although a trend to be reduced is observed in the liver of *Vhl*<sup>-/-Hif2a</sup><sup>-/-</sup> mice, the kidney of *Vhl*<sup>-/-Hif1a</sup><sup>-/-</sup> mice as well as the lung of *Vhl*<sup>-/-Hif2a</sup><sup>-/-</sup> and *Vhl*<sup>-/-Hif1a</sup><sup>-/-</sup> mice (Figures 3–5). *Pgm1* expression showed a significant induction in *Vhl*<sup>-/-</sup> liver and kidney tissue (Figures 3 and 4) and a trend in *Vhl*<sup>-/-</sup> lung tissue (Figure 5). Similar to *Glut1*, the expression of *Pgm1* in the liver and kidney was not affected when compared *Vhl*<sup>-/-</sup> with *Vhl*<sup>-/-Hif2a</sup><sup>-/-</sup> and *Vhl*<sup>-/-Hif1a</sup><sup>-/-</sup> mice (Figures 3 and 4). These data suggest that both HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms might contribute to *Glut1* and *Pgm1* expression in *Vhl*<sup>-/-</sup> mouse tissues analyzed. Therefore, the HIF selectivity of *Glut1* and *Pgm1* appeared to differ in human WT8 cells to that in mouse tissues of *Vhl*<sup>-/-</sup> mice.

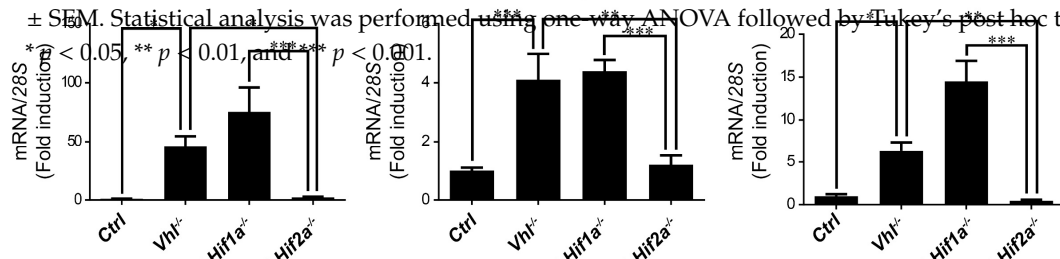
Together these data indicate a different contribution of the bHLH-PAS and NTAD/CTAD halves of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms to the specific activity of these factors on their target genes. Moreover, we show that HIF target selectivity is conserved for some—not all—genes when compared to in vivo mouse tissues and a WT8 renal cell carcinoma cell model.



**Figure 3.** Target gene selectivity for HIF1 $\alpha$  or HIF2 $\alpha$  in the liver of *Vhl*<sup>-/-</sup> mice. Relative *Epo*, *Phd3*, *Ndrgr1*, *Slc7a5*, *Glut1* and *Pgm1* expression in the liver of *Vhl*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 13-14$ ), *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1a*<sup>+/-</sup> mice ( $n = 5-7$ ), *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2a*<sup>+/-</sup> mice ( $n = 12$ ) and the corresponding controls ( $n = 15-18$ ). Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 4.** Target gene selectivity for HIF1 $\alpha$  or HIF2 $\alpha$  in the kidney of *Vhl*<sup>-/-</sup> mice. Relative *Epo*, *Phd3*, *Ndrgr1*, *Slc7a5*, *CalX*, *Glut1* and *Pgm1* expression in the kidney of *Vhl*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 6$ ), *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1a*<sup>+/-</sup> mice ( $n = 3$ ), *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2a*<sup>+/-</sup> mice ( $n = 5$ ) and the corresponding controls ( $n = 8-10$ ). Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .



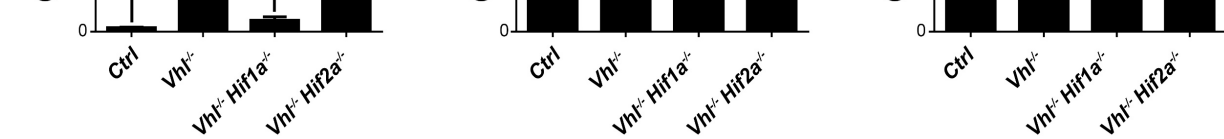
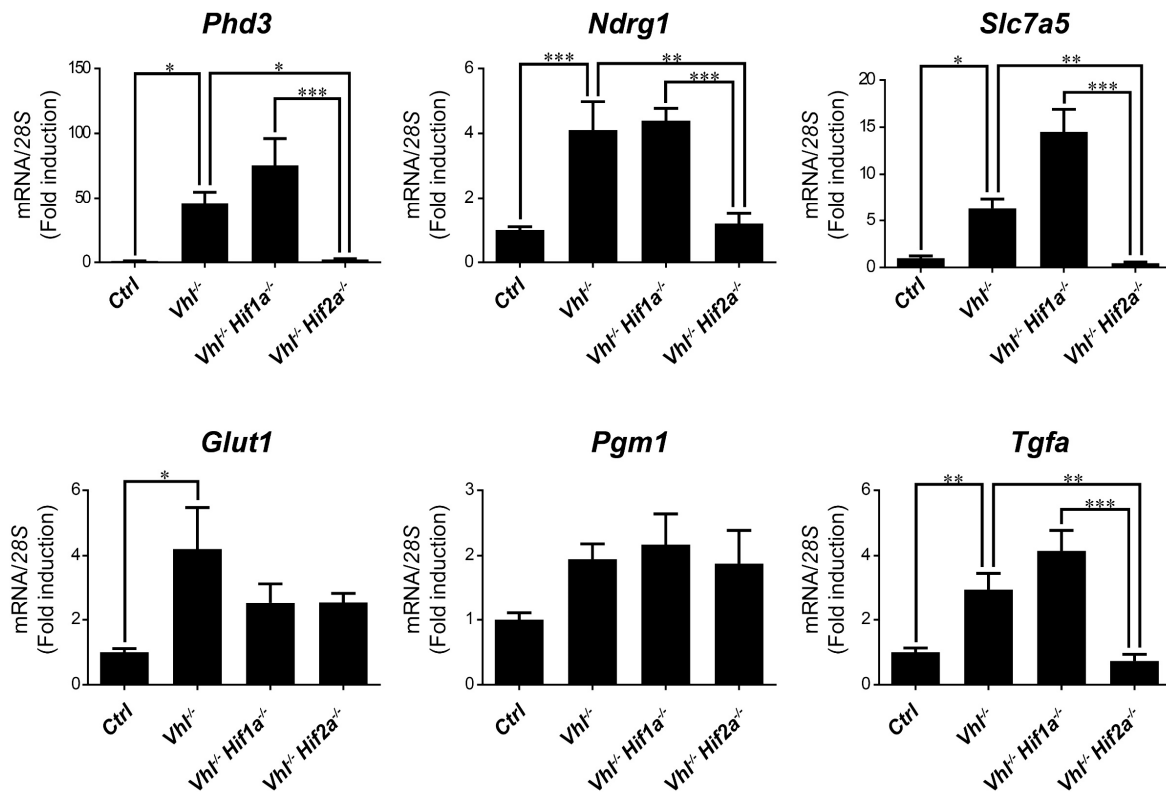


Figure 4



**Figure 5.** Target gene selectivity for HIF1 $\alpha$  or HIF2 $\alpha$  in the lung of *Vhl*<sup>-/-</sup> mice. Relative *Phd3*, *Ndr1*, *Slc7a5*, *Glut1*, *Pgm1* and *Tgfa* expression in the lung of *Vhl*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 4-6$ ), *Vhl*<sup>-/-</sup> *Hif1a*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 5$ ), *Vhl*<sup>-/-</sup> *Hif2a*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 7$ ) and the corresponding controls ( $n = 5-6$ ). Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3. Discussion

The HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms are central factors in the cellular response to hypoxia. However, HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  do not affect all HIF-dependent genes equally. This phenomenon has been investigated in *VHL*-deficient RCC cells characterized by the constitutive activation of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms, and where each isoform has a distinct biological output. Indeed, some HIF-dependent genes like *CAIX* are preferentially induced by the HIF1 $\alpha$  isoform in these RCC cells while other genes like *PHD3* are preferentially induced by the HIF2 $\alpha$  isoform [12,13,27,31,33,35].

In this study we show that HIF isoforms specifically target some genes in an RCC model (WT8 cells), as also manifested in other *Vhl*-deficient biological settings in vivo. Indeed, expression of the *Slc7a5* and *Phd3* genes is preferentially induced by the HIF2 $\alpha$  isoform in the liver, kidney and lung of *Vhl* deficient mice. In addition, *Tgfa* and *Ndr1* expression is also preferentially induced by HIF2 $\alpha$  but not in all the tissues analyzed. In this line *Tgfa* and *Ndr1* expression is induced by HIF2 $\alpha$  in renal cell carcinoma WT8 cells while is not induced in *Vhl*<sup>-/-</sup> kidneys. It cannot be ruled out that *Tgfa* and *Ndr1* expression might be induced in some particular renal cell types in *Vhl*<sup>-/-</sup> kidneys and therefore could not be detected in this RNA analysis in the whole kidney tissue. Along this line, higher expression of *CalX*, *Phd3*, *Slc7a5*, *Glut1*, *Pgm1* occurred but not *Ndr1* in a *Vhl*-deficient renal cell mouse model when compared with non-tumor renal region, which is in line with our data in *Vhl*-deficient kidneys [47]. This study detected an elevated expression of *Tgfa*. This tumor model is a different biological setting than our *Vhl* deficient kidneys. In this line, it might be considered that these tumors are characterized by a specific ccRCC immune microenvironment and that *Vhl* gene inactivation by itself is not enough to initiate the generation of a renal cell carcinoma [48–50], which might explain the differences between these two models regarding *Tgfa* expression. Other HIF-dependent genes show different HIF target



specificity in mice than in human WT8 cells. For example, *GLUT1* gene expression is preferentially controlled by HIF2 $\alpha$  activity in WT8 cells while *PGM1* is preferentially induced by HIF1 $\alpha$  isoform. However, our data also show that elevated *Glut1* and *Pgm1* expression in the *Vhl*-deficient mouse tissues analyzed is not significantly reduced upon *Hif1a* or *Hif2a* inactivation, which suggest that both isoforms might be competent to induce *Glut1* and *Pgm1* in both tissues. Along this line, in contrast to renal cell carcinoma cells, *GLUT1* expression has also been shown to be controlled by HIF1 $\alpha$  in Hep3B cells [13,32]. Furthermore, *SLC7A5* is preferentially induced by HIF2 $\alpha$  in VHL-deficient RCC cells, and in *Vhl*-deficient liver and lung tissue [28,51]. Moreover, HIF2 $\alpha$  controls *SLC7A5* expression in other biological settings, such as neuroblastoma cells [52,53]. In addition, *SLC7A5* expression is consistently induced in a panel of breast cancer cell lines subjected to hypoxia [54]. However, glioblastoma cells not only induce *SLC7A5* in response to hypoxia through HIF2 $\alpha$  but also, the HIF1 $\alpha$  isoform is involved in its expression [55]. The molecular basis of this contrasting HIF selectivity of certain HIF-dependent genes remains unknown. Previous data and those presented here suggest that tissue (or cell) specific factors may influence the participation of HIF1 or HIF2 factors in the regulation of some HIF-dependent genes. In addition the relative abundance of the HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms in each cell type may also contribute in some extent to this HIF target selectivity, particularly if we take into consideration the distinct patterns of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  tissue-specific expression [2,56]. Moreover, differences in HIF selectivity between human and mouse cells cannot be ruled out for some particular HIF-dependent genes.

Previous studies showed that HIF1 target specificity for genes like *CAIX* or *phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)* cannot simply be explained by the preferential binding of HIF1 $\alpha$  to the HRE of these two target genes [13,31]. Indeed, HIF2 $\alpha$  binds to the HRE of these two genes in hypoxic cells or in VHL-deficient RCC cells [13,31]. Along similar lines, a HIF chimeric protein that contains the bHLH-PAS of HIF1 $\alpha$  coupled to the NTAD/CTAD region of HIF2 $\alpha$  cannot induce *CAIX* or *PGK1* gene expression in HEK293 cells or RCC cells [13,31,32], highlighting the relevance of the HIF1 $\alpha$  NTAD/CTAD region to explain HIF1 $\alpha$  target selectivity. Consistent with these data, we also show that a similar HIF (P-A)<sup>2</sup> (N2/C1) construct cannot induce *CAIX* expression but also, that of other HIF1 $\alpha$  target genes like *BNIP3* and *PGM1*. Furthermore, the NTAD region appears to be essential to explain HIF1 $\alpha$  target selectivity [13,31,32]. Conversely, a HIF chimeric protein including the bHLH-PAS of HIF2 $\alpha$  and the NTAD/CTAD region of HIF1 $\alpha$  was sufficient to induce *PGK1* gene transcription in HEK293 cells [13]. These data suggest that the selective *PGK1* expression driven by the HIF1 $\alpha$  isoform can largely be explained by the NTAD in HIF1 $\alpha$ . However, our data show that the HIF chimera that includes the bHLH-PAS of HIF2 $\alpha$  and the NTAD/CTAD region of HIF1 $\alpha$  was not capable of inducing *CAIX*, *BNIP3* and *PGM1* expression in WT8 cells. Two independent studies found similar data regarding *CAIX* expression in 786-O RCC and HEK293 cells [31,32]. These data suggest that the bHLH/PAS region may also be relevant to confer HIF1 $\alpha$  selectivity to some genes like *CAIX*, *BNIP3* and *PGM1*. In this context, the HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoform may also show different DNA binding patterns for some genes [57,58] and therefore, some but not all HIF1 $\alpha$  selective genes like *BNIP3* or *PGM1* might not bind the HIF2 $\alpha$  isoform at their respective promoters. In this line, HIF1 $\alpha$  binding to DNA is associated with histone H3K4me3 modifications while HIF2 $\alpha$  associates with H3K4me1 [57]. Regarding the additional factors that might help HIF1 $\alpha$  to achieve target selectivity, the involvement of the STAT3 transcription factor has been proposed. STAT3 can be recruited specifically to the promoters of HIF1 $\alpha$  target genes like *CAIX*, where it contributes to specific HIF1 $\alpha$  gene expression [32,59]. Thus, it is possible that STAT3 may also participate in the induction of other HIF1-dependent genes, such as *BNIP3* and *PGM1*.

Previous studies have shown that HIF chimeras that include the HIF1 bHLH-PAS and the HIF2 NTAD/CTAD region induce HIF2 $\alpha$  targets genes like *PHD3*, *PAI-1* or adrenomedulin (*ADM*) [13,31,32]. We extended this analysis in WT8 cells to other HIF2 target genes like *OCT-4*, *NDRG1*, *TFGA*, *GLUT1*, *CCND1* and *SLC7A5*. We first found that the expression of these HIF2 $\alpha$  target genes is not induced or minimally affected by a chimeric HIF construct that contains the HIF2 $\alpha$  bHLH-PAS half and the HIF1 $\alpha$  NTAD/CTAD half of the protein. By contrast, a HIF chimera that contains the HIF1 $\alpha$  bHLH-PAS

half and the HIF2 $\alpha$  NTAD/CTAD half is sufficient to induce in a different extent all the HIF2 $\alpha$  target genes analyzed, including the amino acid carrier *SLC7A5*, a HIF2 $\alpha$  target gene previously identified in different biological settings [28]. However, it should be noted that some of the genes analyzed such as *OCT-4* and *NDRG1* are induced by this chimera to a lesser extent than other HIF2 $\alpha$ -dependent genes. These data suggest that the relative contribution of the NTAD/CTAD region of HIF2 $\alpha$  to confer target selectivity can be different in each HIF2 $\alpha$ -dependent gene. The upstream stimulatory factor 2 (USF2) has been involved in the specific HIF2-dependent expression of *EPO* and *SERPINE1*, involving a physical interaction between the USF2 and the HIF2 $\alpha$  NTAD/CTAD region [32,60]. Therefore, it is also possible that USF2 also participates in the HIF2 $\alpha$ -dependent expression of *PHD3*, *OCT-4*, *NDRG1*, *TGFA*, *GLUT1*, *CCND1* and *SLC7A5* in renal cell carcinoma. It should be noted that the HIF chimera that contains the HIF1 $\alpha$  bHLH-PAS half and the HIF2 $\alpha$  NTAD/CTAD half partially induces the expression of most of the HIF2-dependent genes partially, except *PHD3* that is induced with this chimera at higher levels than HIF2 $\alpha$  (P-A)<sup>2</sup>. These data suggest that the HIF2 NTAD/CTAD half might be not sufficient to achieve full HIF2 activity for some HIF2 $\alpha$ -dependent genes. However, as indicated above the HIF (P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) construct is routinely expressed more weakly than HIF2 $\alpha$  (P-A)<sup>2</sup>, which might also explain the partial induction of HIF2 target genes by the HIF (P-A)<sup>2</sup> (N1/C2) construct. Nevertheless, we cannot rule out that the induction of a full HIF2 response requires both the HIF2 $\alpha$  bHLH-PAS and NTAD/CTAD halves to be present. In this line, it has been proposed that the ETS-1 transcription factor confers HIF2 selectivity by interacting with the bHLH-PAS half of the HIF2 $\alpha$  isoform [61]. In addition to ETS-1, Elk-1 is another transcription factor of the ETS family that has been proposed to participate in HIF2 specificity. Again, it is conceivable that the participation of the HIF2 bHLH-PAS region in HIF2 specificity may involve its interaction with ETS-1 and possibly provides a molecular basis of the distinct DNA binding of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  in some HIF-dependent genes referred to above [57].

In general, our data extend the analysis of HIF selectivity to in vivo mouse biological settings where we show that HIF target selectivity can be conserved for some—not all—genes such as *SLC7A5*, *NDRG1* or *TGFA* between human and mouse cells. These data suggest that mechanisms that assure HIF selectivity seem to be conserved during evolution, which might reflect the biological relevance of HIF target specificity. Furthermore, we have shown the involvement of HIF1 bHLH/PAS and NTAD/CTAD regions to confer HIF1 $\alpha$  selectivity for the genes analyzed and the major relevance of HIF2 $\alpha$  NTAD/CTAD region to understand HIF2 target gene specificity. Further studies will be necessary to understand the conserved molecular basis of HIF target gene selectivity especially using in vivo biological settings.

## 4. Methods

### 4.1. Cell Lines and Cell Culture Conditions

The HEK293T and WT8 cell lines were maintained in Dulbecco's high glucose modified Eagle's medium (DMEM: HyClone, GE HealthCare, Chicago, IL, USA) supplemented with 100 units/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 20 mM HEPES and 10% fetal bovine serum (U.S.) (FBS: HyClone, GE HealthCare, Chicago, IL, USA). Cells were maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air (normoxic conditions).

### 4.2. DNA Plasmid Construction

To generate chimeric HIF $\alpha$  versions, a novel XbaI restriction site was introduced on aa 411 of HA-HIF1 $\alpha$ -P402A/P564A and in aa414 of HA-HIF2 $\alpha$ -P405A/P531A [62]. For this purpose the N-terminal half of pBabe-puro HA-HIF1 $\alpha$ -P402A/P564A (1 to 411) was amplified using a forward primer including an ApaI site (forward, 5'-TTCTCTAgggccc(ApaI)GGCCGGAT-3') and a reverse primer including an XbaI site (reverse, 5'-TCGTTGCTGCCAAAAtctaga(XbaI)GATATGATTGTGTCTCC-3'). The C-terminal half of pBabe-puro HA-HIF1 $\alpha$ -P402A/P564A (412 to 826) was amplified using a forward primer including an XbaI site (forward, 5'-GGAGACACAATCATATCtctaga(XbaI)TTTTGGCAGCAACGA-3') and a reverse



primer including an XbaI site (reverse, 5'-TAACTGACACACATtctaga(XbaI)GGGTCCGACCACTGT-3'). The N-terminal half of pBabe-puro HA-HIF2 $\alpha$ -P405A/P531A (1 to 414) was amplified using a forward primer including an ApaI site (forward, 5'-TTCTCTAaggccc(ApaI)GGCCGGAT-3') and a reverse primer including an XbaI site (reverse, 5'-GTTCTGATTCCCGAAAtctaga(XbaI)GAGATGATGGCG-3'). The C-terminal half of pBabe-puro HA-HIF2 $\alpha$ -P405A/P531A (415 to 870) was amplified using a forward primer including an XbaI site (forward, 5'-CGCCATCATCTCtctaga(XbaI)TTTCGGGAATCAGAAC-3') and a reverse primer including an XbaI site (reverse, 5'-TAACTGACACACATtctaga(XbaI)GGGTCCGACCACTGT-3'). After confirmation by DNA sequencing each of these four amplicons were recloned in the pCR<sup>TM</sup>2.1-TOPO<sup>TM</sup> vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Then the N-terminal regions of HA-HIF1 $\alpha$ -P402A/P564A and HA-HIF2 $\alpha$ -P405A/P531A were excised with ApaI-XbaI to be cloned in pLVX-Puro lentiviral expression vector. Finally, the C-terminal region of HA-HIF1 $\alpha$ -P402A/P564A was excised with XbaI-XbaI to be cloned in the pLVX lentiviral expression vector harboring the N-terminal region of HA-HIF2 $\alpha$ -P405A/P531A. Similarly, the C-terminal region of HA-HIF2 $\alpha$ -P405A/P531A was excised with XbaI-XbaI to be cloned in the pLVX-Puro lentiviral expression vector harboring the N-terminal region of HA-HIF1 $\alpha$ -P402A/P564A.

#### 4.3. Lentiviral Infection

For lentiviral infection, HEK293T cells were seeded in p100 plates, and transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 3.9  $\mu$ g of pLP1, 2.7  $\mu$ g of pLP2, 3.3  $\mu$ g of VSVg and 9.9  $\mu$ g of each lentiviral vector. Cell culture supernatants were harvested 24 h after transfection, filtered through a 0.45  $\mu$ m pore filter, and added to WT8 cells along with 8  $\mu$ g/mL polybrene (final concentration). This step was repeated over the next 2 days and the cells were then selected with 1 mg/mL puromycin to obtain polyclonal resistant cell pools.

#### 4.4. Western Blotting and Antibodies

Cells were lysed in Laemmli buffer, and the protein extract was resolved on 10% or 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred to 0.45  $\mu$ m nitrocellulose membranes. The membranes were then blocked and probed with antibodies against: HIF2 $\alpha$  (ab199, Abcam); HIF1 $\alpha$  (610959, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA);  $\beta$ -actin (A3854, Sigma, Saint Louis, MO, USA). Antibody binding was detected by enhanced chemiluminescence (Clarity, BioRad, Hercules, CA, USA; and SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and visualized on a digital luminescent image analyzer (Image Quant LAS4000 Mini; GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

#### 4.5. RNA Extraction, RT-PCR Analysis and Primers

Total RNA from the cells was isolated using Ultraspec or TRIsure (BIO-38032, Bioline USA, Inc., Cincinnati, OH, USA). This RNA (1  $\mu$ g) was then reverse-transcribed using Improm-II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) and polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed using the Power SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a QuantStudio5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primer sets used are included in Supplementary Table S1. The data were analyzed with QuantStudio5 Design and Analysis Software v1.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### 4.6. Mouse Models

C;129S-Vhl<sup>tm1Jae</sup>/J (stock no. 4081, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) were used to generate the UBC-Cre-ER<sup>T2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup> mice. These mice harbor two loxP sites flanking the promoter and exon 1 of the murine Vhl locus [63]. The C;129S-Vhl<sup>tm1Jae</sup>/J mice were crossed with B6.Cg-Ndor1<sup>Tg(UBC-cre/ERT2)1Ejb</sup>/1J or UBC-Cre-ER<sup>T2</sup> mice (Jackson Laboratories, stock no. 008085) that ubiquitously express a tamoxifen-inducible Cre recombinase (Cre-ER<sup>T2</sup>) [64]. UBC-Cre-ER<sup>T2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup> mice were generated through the appropriate crosses, along with the corresponding control mice. Then UBC-Cre-ER<sup>T2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup> Hif1 $\alpha$ <sup>LoxP/LoxP</sup> mice were generated using B6.129-Hif1 $\alpha$ <sup>tm3Rsj0</sup>/J

mice (Jackson Laboratories, stock no. 007561) that harbor two loxP sites flanking exon 2 of the murine *Hif1a* locus [65]. These mice were then crossed with B6.Cg-*Ndor1*<sup>Tg(UBC-cre/ERT2)1Ejb</sup>/J mice as described above to generate *UBC-Cre-ER<sup>T2</sup> Hif1a<sup>LoxP/LoxP</sup>* mice, which were subsequently crossed with C;129S-*Vhl*<sup>tm1Jae</sup>/J mice to generate *UBC-Cre-ER<sup>T2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup> Hif1a<sup>LoxP/LoxP</sup>* mice and their corresponding control mice. The *UBC-Cre-ER<sup>T2</sup> Vhl<sup>LoxP/LoxP</sup> Hif2a<sup>LoxP/LoxP</sup>* mice were generated through the appropriate crosses using *Epas1*<sup>tm1Mcs</sup>/J mice (Jackson Laboratories, stock no. 008407) [66].

#### 4.7. Ethics Statements

All experimental procedures involving mice were first approved by the research ethics committee at the Autonomous University of Madrid (UAM) (CEIC 55-1002-A049, approval date 9 May 2014 and CEIC 103-1993-341 approval date 25 November 2019), and they were carried out under the supervision of animal welfare responsible at the UAM in accordance with Spanish RD 53/2013 and European (EU Directive 2010/63/EU) guidelines.

#### 4.8. Statistical Analysis

Data were expressed as the mean ± SEM (standard error of the mean), and the differences between groups were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA).

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9401/s1>.

**Author Contributions:** A.B. and F.M.-R. and A.A.U. conducted all the experiments. J.A. was involved in the design of the experiments, data analysis, and writing the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2016-76815-R and SAF2017-90794-REDT), Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-106371RB-I00) and Fundació La Marató de TV3 (534/C/2016). A.A.U. is supported by the CAM "Atracción de Talento" program and Universidad Autónoma de Madrid, grant SI1/PJI/2019-00399.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank W.G. Kaelin (Medical Oncology/Molecular and Cellular Department, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA) for providing the vectors encoding HIF1α P402A;P564A, HIF2α P405A;P531A and the corresponding control. We also thank Chris W. Pugh (Nuffield Department of Medicine, University of Oxford) for his help in this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5510–5514. [CrossRef]
2. Tian, H.; McKnight, S.L.; Russell, D.W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 72–82. [CrossRef] [PubMed]
3. Bruick, R.K.; McKnight, S.L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **2001**, *294*, 1337–1340. [CrossRef] [PubMed]
4. Epstein, A.C.R.; Gleadle, J.M.; McNeill, L.A.; Hewitson, K.S.; O'Rourke, J.; Mole, D.R.; Mukherji, M.; Metzen, E.; Wilson, M.I.; 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. [CrossRef]
5. Ivan, M.; Kondo, K.; Yang, H.; Kim, W.; Valiando, J.; Ohh, M.; Salic, A.; Asara, J.M.; Lane, W.S.; Kaelin, W.G., Jr. HIFα targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* **2001**, *292*, 464–468. [CrossRef] [PubMed]
6. Jaakkola, P.; Mole, D.R.; Tian, Y.M.; Wilson, M.I.; Gielbert, J.; Gaskell, S.J.; Von Kriegsheim, A.; Hebestreit, H.F.; Mukherji, M.; Schofield, C.J.; et al. Targeting of HIF-α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **2001**, *292*, 468–472. [CrossRef]
7. Jiang, B.H.; Rue, E.; Wang, G.L.; Roe, R.; Semenza, G.L. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 17771–17778. [CrossRef]

8. Ratcliffe, P.J.; O'Rourke, J.F.; Maxwell, P.H.; Pugh, C.W. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J. Exp. Biol.* **1998**, *201*, 1153–1162.
9. Ortiz-Barahona, A.; Villar, D.; Pescador, N.; Amigo, J.; del Peso, L. Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. *Nucleic Acids Res.* **2010**. [[CrossRef](#)]
10. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **2012**, *148*, 399–408. [[CrossRef](#)]
11. Kaelin, W.G.; Ratcliffe, P.J. Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Mol. Cell* **2008**, *30*, 393–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hu, C.-J.; Wang, L.-Y.; Chodosh, L.A.; Keith, B.; Simon, M.C. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2 $\alpha$  in Hypoxic Gene Regulation. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 9361–9374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hu, C.J.; Sataur, A.; Wang, L.; Chen, H.; Simon, M.C. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ . *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 4528–4542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Iyer, N.V.; Kotch, L.E.; Agani, F.; Leung, S.W.; Laughner, E.; Wenger, R.H.; Gassmann, M.; Gearhart, J.D.; Lawler, A.M.; Yu, A.Y.; et al. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev.* **1998**, *12*, 149–162. [[CrossRef](#)]
15. Semenza, G.L.; Roth, P.H.; Fang, H.M.; Wang, G.L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23757–23763.
16. Kobayashi, H.; Liu, Q.; Binns, T.C.; Urrutia, A.A.; Davidoff, O.; Kapitsinou, P.P.; Pfaff, A.S.; Olauson, H.; Wernerson, A.; Fogo, A.B.; et al. Distinct subpopulations of FOXD1 stroma-derived cells regulate renal erythropoietin. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 1926–1938. [[CrossRef](#)]
17. Rankin, E.B.; Biju, M.P.; Liu, Q.; Unger, T.L.; Rha, J.; Johnson, R.S.; Simon, M.C.; Keith, B.; Haase, V.H. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1068–1077. [[CrossRef](#)]
18. Weidemann, A.; Johnson, R.S. Nonrenal Regulation of EPO Synthesis. *Kidney Int.* **2009**, *75*, 682–688. [[CrossRef](#)]
19. Urrutia, A.A.; Afzal, A.; Nelson, J.; Davidoff, O.; Gross, K.W.; Haase, V.H. Prolyl-4-hydroxylase 2 and 3 coregulate murine erythropoietin in brain pericytes. *Blood* **2016**, *128*, 2550–2560. [[CrossRef](#)]
20. Carmeliet, P.; Dor, Y.; Herber, J.M.; Fukumura, D.; Brusselmans, K.; Dewerchin, M.; Neeman, M.; Bono, F.; Abramovitch, R.; Maxwell, P.; et al. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **1998**, *394*, 485–490. [[CrossRef](#)]
21. Gordan, J.D.; Thompson, C.B.; Simon, M.C. HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. *Cancer Cell* **2007**, *12*, 108–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Shen, C.; Beroukhi, R.; Schumacher, S.E.; Zhou, J.; Chang, M.; Signoretti, S.; Kaelin, W.G. Genetic and functional studies implicate HIF1a as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discov.* **2011**, *1*, 222–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hubbi, M.E.; Kshitz; Gilkes, D.M.; Rey, S.; Wong, C.C.; Luo, W.; Kim, D.H.; Dang, C.V.; Levchenko, A.; Semenza, G.L. A nontranscriptional role for HIF-1 $\alpha$  as a direct inhibitor of DNA replication. *Sci. Signal.* **2013**, *6*, ra10. [[CrossRef](#)]
24. Gordan, J.D.; Bertout, J.A.; Hu, C.J.; Diehl, J.A.; Simon, M.C. HIF-2 $\alpha$  Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing c-Myc Transcriptional Activity. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 335–347. [[CrossRef](#)]
25. Gordan, J.D.; Lal, P.; Dondeti, V.R.; Letrero, R.; Parekh, K.N.; Oquendo, C.E.; Greenberg, R.A.; Flaherty, K.T.; Rathmell, W.K.; Keith, B.; et al. HIF- $\alpha$  Effects on c-Myc Distinguish Two Subtypes of Sporadic VHL-Deficient Clear Cell Renal Carcinoma. *Cancer Cell* **2008**, *14*, 435–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kondo, K.; Klco, J.; Nakamura, E.; Lechpammer, M.; Kaelin, W.G. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 237–246. [[CrossRef](#)]
27. Raval, R.R.; Lau, K.W.; Tran, M.G.B.; Sowter, H.M.; Mandriota, S.J.; Li, J.L.; Pugh, C.W.; Maxwell, P.H.; Harris, A.L.; Ratcliffe, P.J. Contrasting Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 5675–5686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Elorza, A.; Soro-Arnáiz, I.; Meléndez-Rodríguez, F.; Rodríguez-Vaello, V.; Marsboom, G.; de Cárcer, G.; Acosta-Iborra, B.; Albacete-Albacete, L.; Ordóñez, A.; Serrano-Oviedo, L.; et al. HIF2 $\alpha$  Acts as an mTORC1 Activator through the Amino Acid Carrier SLC7A5. *Mol. Cell* **2012**, *48*, 681–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Smith, K.; Gunaratnam, L.; Morley, M.; Franovic, A.; Mekhail, K.; Lee, S. Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5221–5230. [[CrossRef](#)]
30. O'Rourke, J.F.; Tian, Y.M.; Ratcliffe, P.J.; Pugh, C.W. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: Comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2060–2071. [[CrossRef](#)]
31. Lau, K.W.; Tian, Y.M.; Raval, R.R.; Ratcliffe, P.J.; Pugh, C.W. Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor- $\alpha$  in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms. *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 1284–1292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pawlus, M.R.; Wang, L.; Murakami, A.; Dai, G.; Hu, C.J. STAT3 or USF2 Contributes to HIF Target Gene Specificity. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72358. [[CrossRef](#)]
33. Persson, C.U.; von Stedingk, K.; Fredlund, E.; Bexell, D.; Pählman, S.; Wigerup, C.; Mohlin, S. ARNT-dependent HIF-2 transcriptional activity is not sufficient to regulate downstream target genes in neuroblastoma. *Exp. Cell Res.* **2020**, *388*, 111845. [[CrossRef](#)]
34. Sato, M.; Tanaka, T.; Maemura, K.; Uchiyama, T.; Sato, H.; Maeno, T.; Suga, T.; Iso, T.; Ohyama, Y.; Arai, M.; et al. The PAI-1 gene as a direct target of endothelial PAS domain protein-1 in adenocarcinoma A549 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2004**, *31*, 209–215. [[CrossRef](#)]
35. Cho, H.; Du, X.; Rizzi, J.P.; Liberzon, E.; Chakraborty, A.A.; Gao, W.; Carvo, I.; Signoretti, S.; Bruick, R.K.; Josey, J.A.; et al. On-target efficacy of a HIF-2 $\alpha$  antagonist in preclinical kidney cancer models. *Nature* **2016**, *539*, 107–111. [[CrossRef](#)]
36. Hickey, M.M.; Richardson, T.; Wang, T.; Mosqueira, M.; Arguiri, E.; Yu, H.; Yu, Q.C.; Solomides, C.C.; Morrissey, E.E.; Khurana, T.S.; et al. The von Hippel-Lindau Chuvash mutation promotes pulmonary hypertension and fibrosis in mice. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 827–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Meléndez-Rodríguez, F.; Urrutia, A.A.; Lorendeau, D.; Rinaldi, G.; Roche, O.; Böggürçü-Seidel, N.; Ortega Muelas, M.; Mesa-Celler, C.; Turiel, G.; Bouthelier, A.; et al. HIF1 $\alpha$  Suppresses Tumor Cell Proliferation through Inhibition of Aspartate Biosynthesis. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 2257–2265. [[CrossRef](#)]
38. Pelletier, J.; Bellot, G.; Gounon, P.; Lacas-Gervais, S.; Pouysségur, J.; Mazure, N.M. Glycogen synthesis is induced in hypoxia by the hypoxia-inducible factor and promotes cancer cell survival. *Front. Oncol.* **2012**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Chen, W.; Hill, H.; Christie, A.; Kim, M.S.; Holloman, E.; Pavia-Jimenez, A.; Homayoun, F.; Ma, Y.; Patel, N.; Yell, P.; et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature* **2016**, *539*, 112–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Covello, K.L.; Kehler, J.; Yu, H.; Gordan, J.D.; Arsham, A.M.; Hu, C.J.; Labosky, P.A.; Simon, M.C.; Keith, B. HIF-2 $\alpha$  regulates Oct-4: Effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 557–570. [[CrossRef](#)]
41. Betsunoh, H.; Fukuda, T.; Anzai, N.; Nishihara, D.; Mizuno, T.; Yuki, H.; Masuda, A.; Yamaguchi, Y.; Abe, H.; Yashi, M.; et al. Increased expression of system large amino acid transporter (LAT)-1 mRNA is associated with invasive potential and unfavorable prognosis of human clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Higuchi, K.; Sakamoto, S.; Ando, K.; Maimaiti, M.; Takeshita, N.; Okunushi, K.; Reien, Y.; Imamura, Y.; Sazuka, T.; Nakamura, K.; et al. Characterization of the expression of LAT1 as a prognostic indicator and a therapeutic target in renal cell carcinoma. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Miró-Murillo, M.; Elorza, A.; Soro-Arnáiz, I.; Albacete-Albacete, L.; Ordoñez, A.; Balsa, E.; Vara-Vega, A.; Vázquez, S.; Fuertes, E.; Fernández-Criado, C.; et al. Acute Vhl gene inactivation induces cardiac HIF-dependent erythropoietin gene expression. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22589. [[CrossRef](#)]
44. Minamishima, Y.A.; Kaelin, W.G. Reactivation of hepatic EPO synthesis in mice after PHD loss. *Science* **2010**, *329*, 407. [[CrossRef](#)]
45. Kobayashi, H.; Liu, J.; Urrutia, A.A.; Burmakin, M.; Ishii, K.; Rajan, M.; Davidoff, O.; Saifudeen, Z.; Haase, V.H. Hypoxia-inducible factor prolyl-4-hydroxylation in FOXD1 lineage cells is essential for normal kidney development. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 1370–1383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Scortegagna, M.; Morris, M.A.; Oktay, Y.; Bennett, M.; Garcia, J.A. The HIF family member EPAS1/HIF-2 $\alpha$  is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood* **2003**, *102*, 1634–1640. [[CrossRef](#)]



47. Hoefflin, R.; Harlander, S.; Schäfer, S.; Metzger, P.; Kuo, F.; Schönenberger, D.; Adlesic, M.; Peighambari, A.; Seidel, P.; Chen, C.Y.; et al. HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  differently regulate tumour development and inflammation of clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4111. [[CrossRef](#)]
48. Iliopoulos, O.; Kibel, A.; Gray, S.; Kaelin, W.G. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 822–826. [[CrossRef](#)]
49. Guinot, A.; Lehmann, H.; Wild, P.J.; Frew, I.J. Combined deletion of Vhl, Trp53 and Kif3a causes cystic and neoplastic renal lesions. *J. Pathol.* **2016**, *239*, 365–373. [[CrossRef](#)]
50. Harlander, S.; Schönenberger, D.; Toussaint, N.C.; Prummer, M.; Catalano, A.; Brandt, L.; Moch, H.; Wild, P.J.; Frew, I.J. Combined mutation in Vhl, Trp53 and Rb1 causes clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 869–877. [[CrossRef](#)]
51. Bouthelier, A.; Aragonés, J. Role of the HIF oxygen sensing pathway in cell defense and proliferation through the control of amino acid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2020**, *1867*, 118733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Onishi, Y.; Hiraiwa, M.; Kamada, H.; Iezaki, T.; Yamada, T.; Kaneda, K.; Hinoi, E. Hypoxia affects Slc7a5 expression through HIF-2 $\alpha$  in differentiated neuronal cells. *FEBS Open Biol.* **2019**, *9*, 241–247. [[CrossRef](#)]
53. Corbet, C.; Draoui, N.; Polet, F.; Pinto, A.; Drozak, X.; Riant, O.; Feron, O. The SIRT1/HIF2 $\alpha$  axis drives reductive glutamine metabolism under chronic acidosis and alters tumor response to therapy. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 5507–5519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Morotti, M.; Bridges, E.; Valli, A.; Choudhry, H.; Sheldon, H.; Wigfield, S.; Gray, N.; Zois, C.E.; Grimm, F.; Jones, D.; et al. Hypoxia-induced switch in SNAT2/SLC38A2 regulation generates endocrine resistance in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 12452–12461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Zhang, B.; Chen, Y.; Shi, X.; Zhou, M.; Bao, L.; Hatanpaa, K.J.; Patel, T.; DeBerardinis, R.J.; Wang, Y.; Luo, W. Regulation of branched-chain amino acid metabolism by hypoxia-inducible factor in glioblastoma. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wiesener, M.S.; Jürgensen, J.S.; Rosenberger, C.; Scholze, C.K.; Hörstrup, J.H.; Warnecke, C.; Mandriota, S.; Bechmann, I.; Frei, U.A.; Pugh, C.W.; et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* **2003**, *17*, 271–273. [[CrossRef](#)]
57. Smythies, J.A.; Sun, M.; Masson, N.; Salama, R.; Simpson, P.D.; Murray, E.; Neumann, V.; Cockman, M.E.; Choudhry, H.; Ratcliffe, P.J.; et al. Inherent DNA-binding specificities of the HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  transcription factors in chromatin. *EMBO Rep.* **2019**, *20*, e46401. [[CrossRef](#)]
58. Schödel, J.; Mole, D.R.; Ratcliffe, P.J. Pan-genomic binding of hypoxia-inducible transcription factors. *Biol. Chem.* **2013**, *394*, 507–517. [[CrossRef](#)]
59. Pawlus, M.R.; Wang, L.; Hu, C.J. STAT3 and HIF1 $\alpha$  cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 1670–1679. [[CrossRef](#)]
60. Pawlus, M.R.; Wang, L.; Ware, K.; Hu, C.J. Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  (HIF2 $\alpha$ ) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Mol. Cell Biol.* **2012**, *32*, 4595–4610. [[CrossRef](#)]
61. Elvert, G.; Kappel, A.; Heidenreich, R.; Englmeier, U.; Lanz, S.; Acker, T.; Rauter, M.; Plate, K.; Sieweke, M.; Breier, G.; et al. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7520–7530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Yan, Q.; Bartz, S.; Mao, M.; Li, L.; Kaelin, W.G. The hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  N-terminal and C-terminal transactivation domains cooperate to promote renal tumorigenesis in vivo. *Mol. Cell Biol.* **2007**, *27*, 2092–2102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Haase, V.H.; Glickman, J.N.; Socolovsky, M.; Jaenisch, R. Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 1583–1588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ruzankina, Y.; Pinzon-Guzman, C.; Asare, A.; Ong, T.; Pontano, L.; Cotsarelis, G.; Zediak, V.P.; Velez, M.; Bhandoola, A.; Brown, E.J. Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* **2007**, *1*, 113–126. [[CrossRef](#)]
65. Ryan, H.E.; Lo, J.; Johnson, R.S. HIF-1  $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* **1998**, *17*, 3005–3015. [[CrossRef](#)]

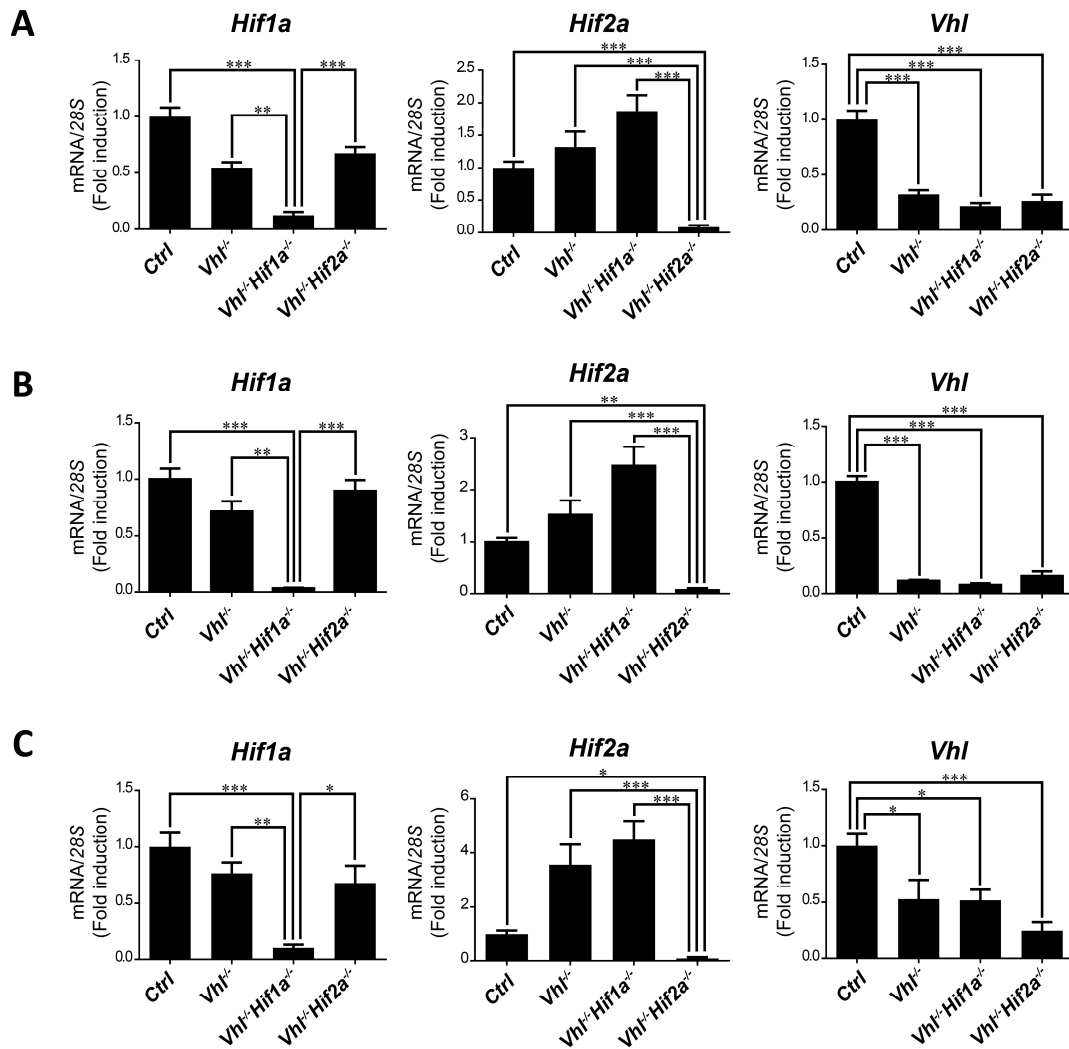
66. Gruber, M.; Hu, C.J.; Johnson, R.S.; Brown, E.J.; Keith, B.; Simon, M.C. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2301–2306. [[CrossRef](#)]

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Differential Contribution of N- and C-Terminal Regions of HIF1 $\alpha$ and HIF2 $\alpha$ to Their Target Gene Selectivity



**Figure S1.** *Vhl*, *Hif1a* and *Hif2a* gene expression in *Vhl*<sup>-/-</sup>, *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1a*<sup>+/-</sup> and *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2a*<sup>+/-</sup> mice. Relative *Hif1a*, *Hif2a* and *Vhl* expression in the liver (A), kidney (B) and lung (C) of *Vhl*<sup>-/-</sup> mice (*n* = 4–14), *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif1a*<sup>+/-</sup> mice (*n* = 3–7), *Vhl*<sup>-/-</sup>*Hif2a*<sup>+/-</sup> mice (*n* = 5–12) and the corresponding controls (*n* = 5–18). Data are shown as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, and \*\*\* *p* < 0.001.







**Table S1.** List of human and mouse primers sequences used in the present study.

<b>HUMAN</b>		
28S	Forward	5'-GGTAGCCAAATGCCTCGTCAT-3'
	Reverse	5'-GGATAGTAGGTAGGGACAGTGGGAAT-3'
BNIP3	Forward	5'-TCAAGTCGGCCGAAAATAT-3'
	Reverse	5'-GCGCTTCGGGTGTTTAAAGA-3'
CAIX	Forward	5'-GGGCCCCGAAGAAAACAGT-3'
	Reverse	5'-GACCTGAGTCTCTGAGCCTTCCT-3'
PGM1	Forward	5'-AGCATTCCGTATTTCCAGCAG-3'
	Reverse	5'-GCCAGTTGGGGTCTCATACAAA-3'
PHD3	Forward	5'-GCCGGCTGGGCAAATACTA-3'
	Reverse	5'-CCGGATAGCAAGCCACCAT-3'
SLC7A5	Forward	5'-GGAACATTGTGCTGGCATTATACA-3'
	Reverse	5'-CCTCTGTGACGAAATTCAAGTAATTC-3'
CCND1	Forward	5'-CTGTGCATCTACACCGACAACCTC-3'
	Reverse	5'-AGGTTCCACTTGAGCTTGTTAC-3'
GLUT1	Forward	5'-TCAACCGCAACGAGGAGAA-3'
	Reverse	5'-CTGTCCC GCGCAGCTT-3'
TGFA	Forward	5'-CACTCAGTTCTGCTTCCATGGA-3'
	Reverse	5'-CGTACCCAGAATGGCAG-3'
OCT-4	Forward	5'-GCTTAGCTTCAAGAACATGTGTA-3'
	Reverse	5'-CTCTCACTCGGTTCTCGAT-3'
NDRG1	Forward	5'-CGGCAACCTGCACCTGTT-3'
	Reverse	5'-TGTGGGTTCCCGGCATT-3'
<b>MOUSE</b>		
Vhl	Forward	5'-ATCCCTGAAGAGCCAAAGATGA-3'
	Reverse	5'-TCGACGTTCAGAACTCATCTTTTT-3'
Hif1a	Forward	5'-CACCGATTCCGCATGGA-3'
	Reverse	5'-TCGACGTTCAGAACTCATCTTTTT-3'
Hif2a	Forward	5'-CCTGGCCATCAGCTTCCTT-3'
	Reverse	5'-GGTCGGCCTCAGCTTCAG-3'
Phd3	Forward	5'-TGGACAACCCCAATGGTGAT-3'
	Reverse	5'-GCAGGACCCCTCCATGTAAC-3'
Ndr1	Forward	5'-TGGAGTCCTTACCAGTTTGG-3'
	Reverse	5'-CGAAGCGGGTCAGGATGTAG-3'
Slc7a5	Forward	5'-TTCGCCACCTACTTGCTCAA-3'
	Reverse	5'-CCTTTACGCTGTAGCAGTTC-3'
Glut1	Forward	5'-TCGTGCTTGGCATCCTTATTG-3'
	Reverse	5'-GAGCAGCAGAGGCCACAAGT-3'
Pgm1	Forward	5'-CGAGAAGGACGTTGCCAAGA-3'
	Reverse	5'-GGGACACTTTCAGAGCAATGG-3'
Tgfa	Forward	5'-GGCTCTGGAGAACAGCACATC-3'
	Reverse	5'-GGAATCTGGGCACTTGTTGAA-3'
Epo	Forward	5'-CAAAGTCAACTTCTATGCTTGGAAA-3'
	Reverse	5'-CAGGCCTTGCCAAACTTCTATG-3'
CaIX	Forward	5'-GCGCTAAGCAGCTCCATACTC-3'
	Reverse	5'-CGTGGCTCGGAAGTTCAGTT-3'

Article

# LAT-1 and GLUT-1 Carrier Expression and Its Prognostic Value in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors

Miguel Sampedro-Núñez <sup>1,2</sup>, Antonio Bouthelier <sup>3</sup>, Ana Serrano-Somavilla <sup>1,2</sup>, Rebeca Martínez-Hernández <sup>1,2</sup> , Magdalena Adrados <sup>4</sup>, Elena Martín-Pérez <sup>5</sup>, José Luis Muñoz de Nova <sup>5</sup> , José Manuel Cameselle-Teijeiro <sup>6</sup> , Concepción Blanco-Carrera <sup>7</sup>, José Manuel Cabezas-Agricola <sup>8</sup>, José Ángel Díaz <sup>9</sup>, Rogelio García-Centeno <sup>10</sup>, Julian Aragonés <sup>3,11</sup> and Mónica Marazuela <sup>1,2,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Services of Endocrinology, Hospital Universitario de la Princesa, 28006 Madrid, Spain; miguelantonio.sampedro@salud.madrid.org (M.S.-N.); ana.serrano@salud.madrid.org (A.S.-S.); rebeca.martinez@salud.madrid.org (R.M.-H.)
  - <sup>2</sup> Immunology and Molecular Biology Unit, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto Princesa, 28006 Madrid, Spain
  - <sup>3</sup> Research Unit, Hospital of Santa Cristina, Research Institute Princesa (IP), Autonomous University of Madrid, 28009 Madrid, Spain; antonio.bouthelier@salud.madrid.org (A.B.); julian.aragonés@salud.madrid.org (J.A.)
  - <sup>4</sup> Service of Pathology, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, 28006 Madrid, Spain; mmagdalena.adrados@salud.madrid.org
  - <sup>5</sup> Service of Surgery and Digestive Surgery, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto Princesa, 28006 Madrid, Spain; emperez@salud.madrid.org (E.M.-P.); jmunoz@salud.madrid.org (J.L.M.d.N.)
  - <sup>6</sup> Service of Pathology, Hospital Clinico Universitario, Universidad de Santiago de Compostela, 15706 A Coruña, Spain; josemanuel.cameselle@usc.es
  - <sup>7</sup> Service of Endocrinology, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Universidad de Alcalá de Henares, 28805 Madrid, Spain; concepcion.blanco@salud.madrid.org
  - <sup>8</sup> Service of Endocrinology, Hospital Clinico Universitario, Universidad de Santiago de Compostela, 15706 A Coruña, Spain; jose.manuel.cabezas.agricola@sergas.es
  - <sup>9</sup> Service of Endocrinology, Hospital Clinico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; joseangel.diaz@salud.madrid.org
  - <sup>10</sup> Service of Endocrinology, Hospital Universitario Gregorio Marañón, 28007 Madrid, Spain; rogelio.garcia@salud.madrid.org
  - <sup>11</sup> CIBER de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Carlos III Health Institute, 28029 Madrid, Spain
- \* Correspondence: monica.marazuela@salud.madrid.org; Tel.: +34-915-202494

Received: 3 September 2020; Accepted: 12 October 2020; Published: 13 October 2020



**Simple Summary:** Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) represent about 70% of all NETs; however, improvement in their outcomes has yet to be achieved. Here, we aimed to analyze the role of metabolic players such as the amino acid transporter 1 (LAT-1) and glucose transporter 1 (GLUT-1), regulated by the oxygen-sensing mechanism Von Hippel Lindau-hypoxia-inducible factor (VHL-HIF), in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NET). We also aimed to correlate them with tumor malignancy and progression. We confirmed that specific mechanisms that increase nutrient uptake, such as LAT-1 and GLUT-1, are increased in GEP-NETs, whereas pVHL is decreased. Our results suggest that these biomarkers could have a potential role in NET pathophysiology which might be related to their proliferation and metastatic capacity.

**Abstract:** Cancer cells develop mechanisms that increase nutrient uptake, including key nutrient carriers, such as amino acid transporter 1 (LAT-1) and glucose transporter 1 (GLUT-1), regulated by the oxygen-sensing Von Hippel Lindau-hypoxia-inducible factor (VHL-HIF) transcriptional

pathway. We aimed to analyze these metabolic players in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NET) and correlate them with tumor malignancy and progression. LAT-1, GLUT-1, and pVHL expression was analyzed in 116 GEP-NETs and 48 peritumoral tissue samples by immunohistochemistry. LAT-1 was stably silenced using specific shRNA in the human NET BON cell line. LAT-1 expression was significantly increased in tumor tissue compared to non-tumor tissue in both gastrointestinal (67% vs. 44%) and pancreatic NETs (54% vs. 31%). Similarly, GLUT-1 was substantially elevated in gastrointestinal (74% vs. 19%) and pancreatic (58% vs. 4%) NETs. In contrast, pVHL expression was decreased (85% vs. 58%) in pancreatic NETs. Tumors with metastases at diagnosis displayed increased LAT-1 and GLUT-1 and decreased pVHL expression ( $p < 0.001$ ). In accordance with these data, silencing LAT-1 curtailed cell proliferation in BON cells. These findings suggest that specific mechanisms that increase nutrient uptake, such as LAT-1 and GLUT-1, are increased in GEP-NETs, whereas pVHL is decreased. These markers might be related to the proliferation and metastatic capacity of these tumors.

**Keywords:** neuroendocrine tumors; LAT-1; GLUT-1; biomarker; gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors

---

## 1. Introduction

Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) comprise an eclectic group of infrequent neoplasms that arise from enterochromaffin epithelial cells or from a variety of other neuroendocrine (NE) cells (e.g., alpha or beta cells, among others). Primary lesions of GEP-NETs tend to be found in the gastric mucosa, small and large intestine, rectum, and pancreas. GEP-NETs represent about 70% of all NETs [1] and, despite the rise in GEP-NET diagnoses, a concomitant improvement in outcomes has yet to be detected. Unlike other malignancies, the natural history of NETs is unpredictable and most well differentiated GEP-NETs remain indolent, even after the appearance of metastases, whereas others may progress rapidly with a median survival of 5–56 months [2]. Clinical guidelines have clearly defined disease stage by the tumor, lymph node, and metastasis (TNM) classification and tumor grade as the two major independent prognostic parameters for GEP-NET diagnosis [3,4]. While surgical resection of malignant tissue is the leading treatment option for GEP-NETs, a complete cure is rarely possible and several therapies are used, including targeted therapies (somatostatin analogues, everolimus, and sunitinib) and/or chemotherapy. Thus, characterization of biomarkers of prognosis and therapeutic response for these neoplasms is imperative [5].

Tumors require vast amounts of nutrients for biochemical reactions; consequently, a continuous supply is essential for their survival. The management of these nutrients is a crucial process that begins with their uptake from the extracellular space to the cytoplasm by specific transporters. Cancer cells generally overexpress some of these transporters in order to guarantee a massive influx of such nutrients to support their high proliferation rates. Given that amino acids (AA) are indispensable for tumor cell growth and metabolism, enhanced AA uptake is critical for tumor progression. Among the different essential amino acid (EAA) carriers, the large neutral amino acid transporter 1 (LAT-1, SLC7A5) is highly expressed in many cancer types. Thus, LAT-1 expression has been associated with tumor behavior and prognosis in certain cancers, including non-small cell lung cancer [6], prostate cancer [7], melanoma of the skin [8], breast cancer [9], gastric cancer [10], and renal cell carcinoma [11]. Some of these tumors are more related to metastases than others [12–14]. Likewise, LAT-1 is found in normal adults in highly proliferative tissues, including the gastrointestinal mucosa and pancreatic islet cells [15]; however, despite LAT constitutive expression in the intestine and pancreas, little is known about its role in GEP-NETs.

One of the cancer metabolic hallmarks is the switch from glucose oxidative phosphorylation to “aerobic glycolysis”, known as the Warburg effect [16]. This switch provides cancer cells with increased

amount of energetic and anabolic supplies to support their extraordinary growth and invasiveness. GLUT-1 has received most of the attention within the glucose membrane transporter (GLUT) family, given its contribution to tumor glucose metabolism [17] and the fact that upregulation of GLUT-1 can substantially enhance glucose uptake and produce energy via accelerated glycolysis. GLUT-1 is overexpressed in various cancer types including breast cancer, gastric adenocarcinoma, sarcomas, lymphomas, melanomas, and hepatoblastomas [18–20]. GLUT-1 expression has likewise been linked to increased cell proliferation and tumor growth, promoting metastatic behavior, higher tumor grade, and poor clinical outcome [16]. GLUT-1 expression is increased in GEP-NETs and is significantly higher in grade 2 compared to grade 1 tumors [21]. A significant correlation between the Ki67 proliferation index and GLUT1 gene expression has been previously reported [22].

The expression of both LAT-1 and GLUT-1 transporters in tumor cells has been linked to hypoxia-inducible factors (HIFs). Indeed, HIF activation induces LAT-1 and GLUT-1 expression [11,17,23]. In normoxic conditions, HIF $\alpha$  subunits are hydroxylated by the prolyl-hydroxylases (PHD) allowing the binding of ubiquitin-ligase Von Hippel Lindau (VHL). In contrast, in hypoxic conditions, PHDs lack sufficient oxygen to hydroxylate the key proline residues leading to HIF $\alpha$  subunit stabilization. Mutations within the VHL gene disrupt the interaction between HIF $\alpha$  and pVHL, leading to constitutive HIF activation and expression of HIF targets involved in many cellular processes, including angiogenesis and cell metabolism [24,25]. Although VHL mutation is rare in sporadic pancreatic NETs, its inactivation is a significant pathway in the development of sporadic pancreatic NETs [26–28].

In this context, we sought to analyze the presence of metabolic players related to nutrient uptake and hypoxia such as LAT-1 and GLUT-1 in GEP-NETs and its possible relation with certain VHL mediated hypoxia pathways. We found that LAT-1 was overexpressed in tumor tissues compared to adjacent non-tumor tissue. Moreover, tumor cell proliferation was diminished upon LAT-1 silencing. Results from our study strongly suggest a potential role for LAT-1 in NET pathophysiology.

## 2. Results

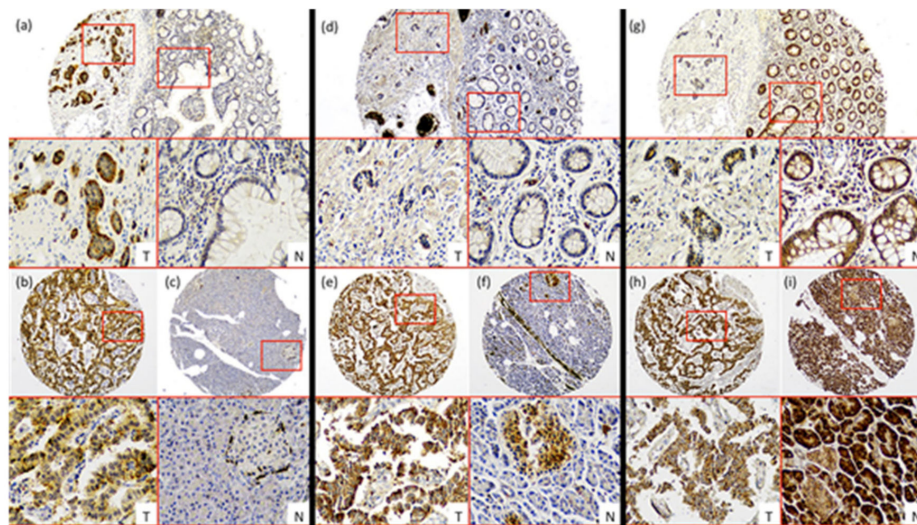
### 2.1. Expression of LAT-1 and Other Angiogenesis Markers in GEP-NETs

We began by applying a tissue microarray (TMA) approach to investigate immunohistochemical expression of LAT-1, GLUT-1, and pVHL in a large set of GEP-NET tumor samples. For LAT-1 immunodetection, we used antibodies previously utilized for GLUT-1 and VHL immunodetection in paraffin sections [29,30] and a commercially available antibody (see Methods) capable of recognizing human LAT-1 in paraffin sections (Figure S1). LAT-1 expression was first assessed by immunohistochemistry (IHC) in tumor and peritumoral pancreatic or gastrointestinal tissue samples. We also validated LAT-1 expression by single cell immunofluorescence (Figure S2a) and flow cytometry (Figure S2a) in tumor cells from a single NET patient. Percentages of staining were calculated following previous criteria [31] and as described in Material and Methods.

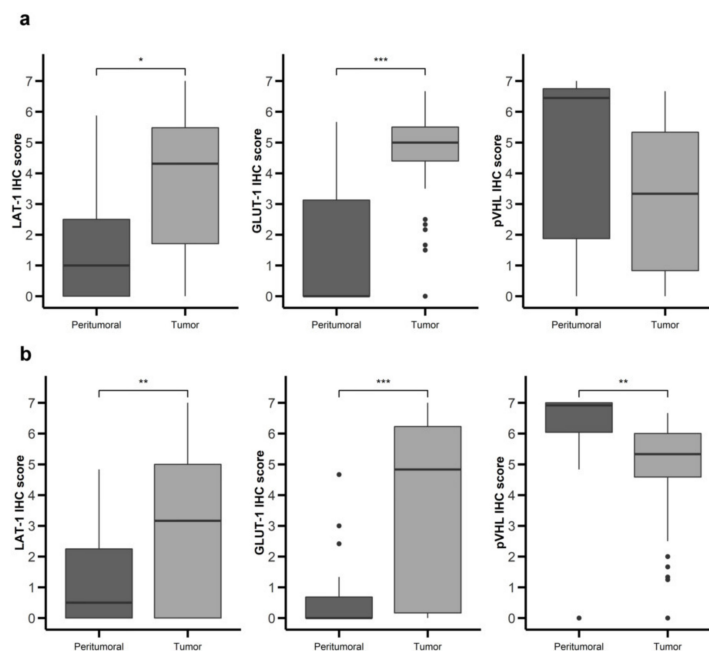
LAT-1 staining showed a strong membranous signal in tumor cells (Figure 1a,b). Noteworthy, LAT-1 staining was more prominent in both gastroenteric (GE) (Figures 1a and 2a) and pancreatic NETs (Figures 1b and 2b) compared to adjacent, healthy, peritumoral tissue (67% vs. 44% and 54% vs. 31%, respectively;  $p < 0.05$ ).

Similarly, the GLUT-1 signal was more conspicuous in both GE (Figures 1d and 2a) (74% vs. 19%;  $p < 0.001$ ) and pancreatic tumors (Figures 1e and 2b) (58% vs. 4%;  $p < 0.001$ ) than in healthy tissue. Immunodetection of LAT-1 and GLUT-1 was decreased in normal neuroendocrine (NE) cells from adjacent tissues with respect to NE cells from tumor tissues (Figure 1c,f). LAT-1 and GLUT-1 staining was only observed in sporadic Langerhans islet cells in normal pancreatic tissue and in sporadic crypt cells in normal intestinal tissues.

In contrast, the pVHL expression signal was weaker in tumor cells (Figure 1g,h) compared to NE cells from peritumoral or control samples (Figure 1g,i), in both GE (Figures 1g and 2a) and pancreatic NETs (Figures 1h and 2b) (38% vs. 67% and 58% vs. 85%, respectively;  $p < 0.01$ ).



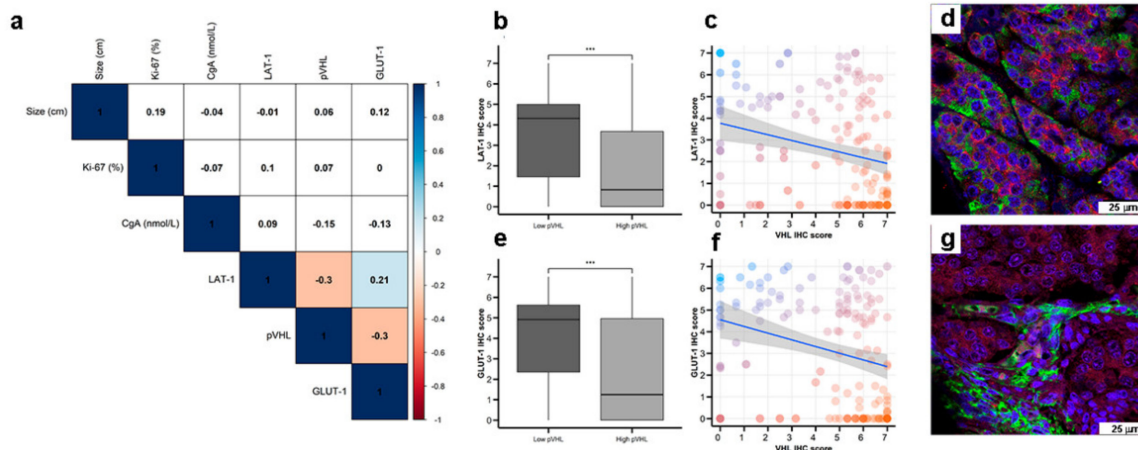
**Figure 1.** Characterization of nutrient transport markers in Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs). Representative cases of immunohistochemistry performed in a tissue microarray (TMA) of GEP-NET. (a–c) LAT-1 immunohistochemistry. (d–f) GLUT-1 immunohistochemistry and (g–i) pVHL immunohistochemistry. First row: intestinal tumors (a,d,g), tumor [T]/normal [N] zones with their respective magnification inset [T/N]. Second row: (b,e,h) pancreatic tumor and (c,f,i) normal tissue from the same tumor sample with their respective magnification inset [T/N]. Original magnification 4× with 20× digital zoom (insets).



**Figure 2.** Nutrient transport markers are differentially expressed in GEP-NETs compared to normal adjacent tissue. LAT-1, GLUT-1, and pVHL were measured by immunohistochemistry (IHC) in a set of TMAs ( $n = 164$ ) from GEP-NETs, including primary and metastatic tissue. Values are represented as boxplot of IHC scores in tumor tissue and in normal peritumoral tissue. (a) Comparison in gastroenteric NETs. (b) Comparison in pancreatic NETs. Boxplots visualize five statistics (the median, first quartile, third quartile, and two whiskers). The upper and lower hinges correspond to the third (75th percentile) and first (25th percentile) quartiles. The upper whisker extends from the hinge to the largest value no further than 1.5 fold the interquartile range (IQR) of the hinge. The lower whisker extends from the hinge to the smallest value at most 1.5 fold the IQR of the hinge. Asterisks indicate significant differences between tumor and peritumoral tissues (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).



Interestingly, LAT-1 and GLUT-1 expression correlated (Figure 3a, Spearman rho 0.21,  $p < 0.01$ ). Furthermore, LAT-1 and GLUT-1 expression inversely correlated with pVHL expression (both Spearman rho  $-0.3$ ,  $p < 0.001$ ) in pancreatic and GE tumors (Figure 3b,c,e,f). In this regard, tumor cells that show higher signal for LAT-1 (Figure 3d) or GLUT-1 (Figure 3g) expression show less or not detectable signal for pVHL expression on dual immunofluorescence analysis. No correlation was found between expression of these molecules with a marker of NE differentiation (Chromogranin A) (Figure 3a).



**Figure 3.** Co-expression of nutrient transport markers and VHL in GEP-NETs. LAT-1, GLUT-1, and pVHL were measured by IHC in a set of TMAs ( $n = 164$ ) from GEP-NETs, including primary and metastatic tissue. (a) Correlation map of hypoxia marker expression in TMAs with tumor size and Ki67 and Chromogranin A (CgA). Values represent the Spearman's rank correlation coefficient, rho ( $\rho$ ). Significant negative correlations are shown in orange and significant positive correlations in blue. Color intensity increases with the magnitude of correlation. White indicates non-significant correlation. (b) Boxplot of LAT-1 IHC scores in low and high pVHL tumor tissues. (c) Scatter plot of LAT-1 and pVHL (regression line is represented with confidence interval). (d) Double immunofluorescence with LAT-1 (green) and pVHL (red) in intestinal tumor tissue. (e) Boxplot of GLUT-1 IHC scores in low and high pVHL tumor tissues. (f) Scatter plot of GLUT-1 and pVHL (regression line is represented with confidence interval). (g) Double immunofluorescence was performed with GLUT-1 (green) and pVHL (red) in intestinal tumor tissue. Scale bar for 75  $\mu\text{m}$  is represented with a white box for each panel. Boxplots visualize five statistics (the median, first quartile, third quartile, and two whiskers). The upper and lower hinges correspond to the third (75th percentile) and first (25th percentile) quartiles. The upper whisker extends from the hinge to the largest value no further than 1.5 fold the interquartile range (IQR) of the hinge. The lower whisker extends from the hinge to the smallest value at most 1.5 fold the IQR of the hinge. Asterisks indicate significant differences between tumor and peritumoral tissues (\*\* $p < 0.001$ ).

## 2.2. LAT-1 Expression Associates with Increased GEP-NET Malignancy

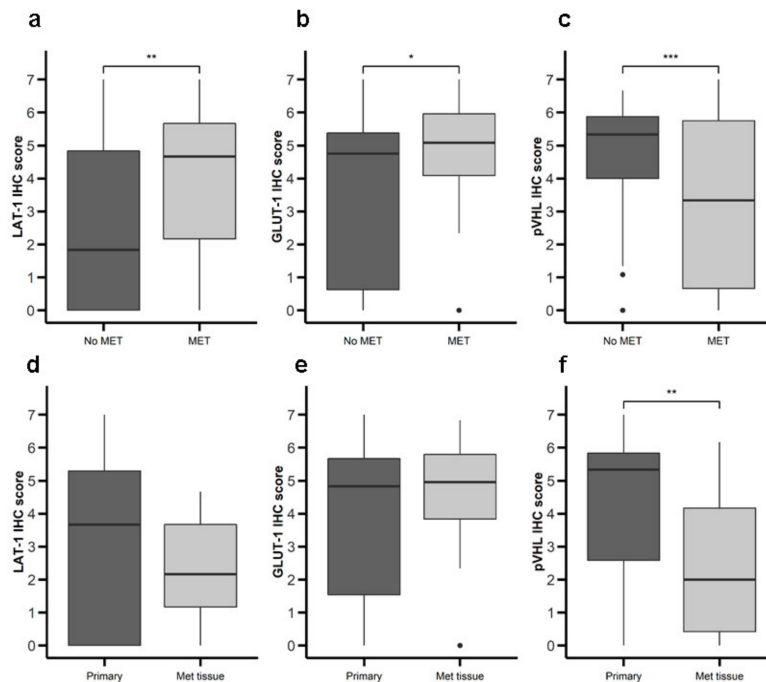
We proceeded to analyze the possible relationship between expression of LAT-1, GLUT-1, and pVHL and malignancy (Table 1). Primary tumor tissue from patients with metastatic disease at diagnosis exhibited greater LAT-1 (Figure 4a) and GLUT-1 (Figure 4b) expression and lower pVHL (Figure 4c) expression compared to tumors from patients with non-metastatic disease at diagnosis. Comparing primary to metastatic samples, we detected no difference in LAT-1 or GLUT-1 (Figure 4d,e), but found lower pVHL expression in metastatic tissue (Figure 4f). We did not find differences between LAT-1, GLUT-1, and pVHL expression associated with tumor grading and stage of disease (data not shown). No differences in survival rates were found comparing patients with high vs. low expression of any of the markers studied (data not shown).

**Table 1.** Patients' baseline characteristics (*n* = 110) and sample characteristics (*n* = 164).

<b>Gender</b>	<b>Number of Patients (Percentage)</b>
Male	47 (42.7%)
Female	63 (57.3%)
<b>Age, years (at diagnosis)</b>	
<55	46 (41.8%)
≥55	64 (58.2%)
<b>Stage (ENETS at diagnosis)</b>	
I	32 (29.1%)
II	20 (18.2%)
III	19 (17.3%)
IV	36 (32.7%)
Unknown	3 (2.7%)
<b>Primary site</b>	
Pancreatic NET	48 (43.6%)
Gastroenteric NET	62 (56.4%)
<b>Primary tumor size, cm</b>	
<3.0	69 (62.7%)
≥3.0	37 (33.7%)
Unknown	4 (3.6%)
<b>Grading (WHO 2010 criteria)</b>	
G1	66 (60%)
G2	34 (30.9%)
G3	4 (3.6%)
Unknown	6 (5.5%)
<b>Sample characteristics (<i>n</i> = 164)</b>	
Primary tumor tissue	104 (63.4%)
Metastatic tumor tissue	12 (7.3%)
Adjacent non-tumor tissue	48 (29.3%)

Abbreviations: TNM: tumor, lymph node, metastasis; ENETS: European Neuroendocrine Tumor Society; NET: neuroendocrine tumor; WHO: World Health Organization; G1: Grade 1; G2: Grade 2; G3: Grade 3.

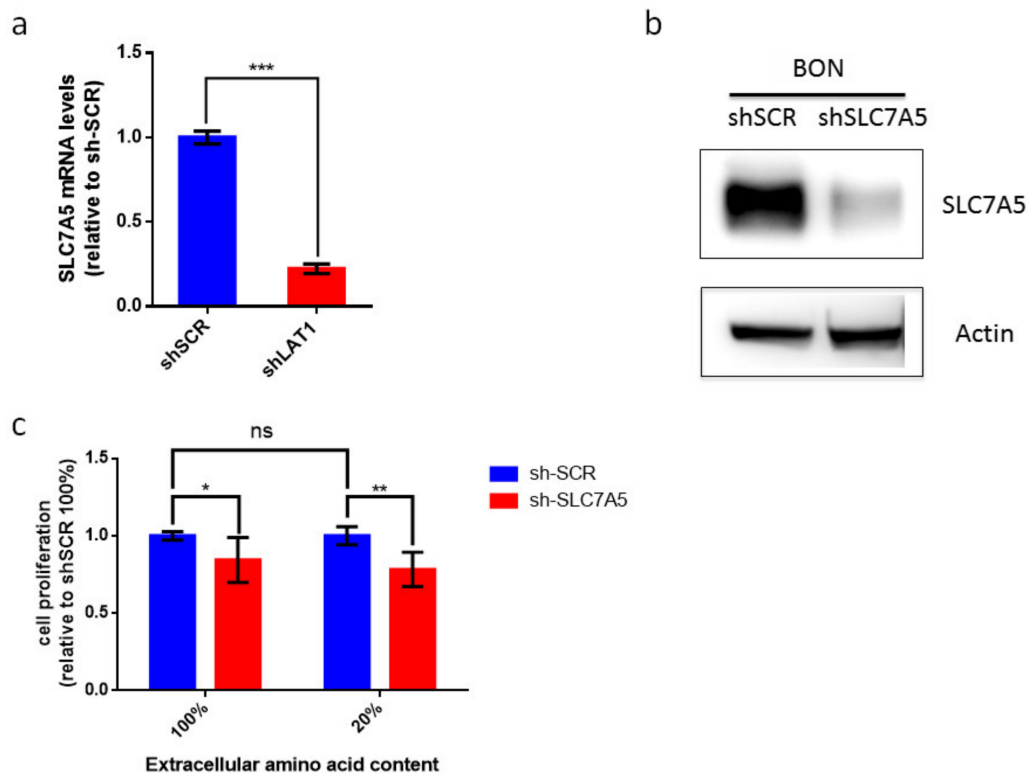




**Figure 4.** Expression of nutrient transport components and Von Hippel Lindau(VHL) in primary NETs with or without metastasis. LAT-1, GLUT-1, and pVHL were measured by IHC in a set of TMAs ( $n = 164$ ) from GEP-NETs. Values are represented as boxplot of IHC scores. (a–c) Samples were classified based on metastatic status at the time of diagnosis: patients with metastasis (MET) or without metastasis (No MET). (d–f) Primary tumor tissue samples were compared to metastatic tumor tissue. Boxplots visualize five statistics (the median, first quartile, third quartile, and two whiskers). The upper and lower hinges correspond to the third (75th percentile) and first (25th percentile) quartiles. The upper whisker extends from the hinge to the largest value no further than 1.5 fold interquartile range (IQR) of the hinge. The lower whisker extends from the hinge to the smallest value at most 1.5 fold IQR of the hinge. Asterisks indicate significant differences between tumor and peritumoral tissues (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 2.3. Role of LAT-1 in NET Cell Proliferation

Our data suggest that LAT-1 (SLC7A5) expression can facilitate neuroendocrine tumor progression. The amino acid carrier LAT-1 is involved in the uptake of essential amino acids that subsequently leads to cell proliferation [11,32]. Consequently, we speculated that LAT-1 might control cell-autonomous proliferation in NETs. We therefore used the BON human cell line that derives from an enterochromaffin cell serotonin-producing pancreatic neuroendocrine tumor [33]. We first found that BON cells displayed basal mRNA and protein levels of LAT-1 (SLC7A5) (Figure 5a,b). Consequently, we generated BON-sh-SLC7A5 in which LAT-1 was silenced, as well as the corresponding BON-shScramble control cell line (Figure 5a,b; unprocessed Western blot images can be found in Figures S3–S5). Earlier studies have revealed that the impact of LAT-1 on tumor cell proliferation is evinced more clearly when extracellular amino acid content is reduced in cell culture media, thereby mimicking insufficient amino acid supply at the core of solid tumors [11,34,35]. Thus, we cultured BON-sh-SLC7A5 and BON-shScramble cells, not only in normal media (100% amino acid content), but also in media containing 20% of total amino acid content. Our data show that BON-sh-SLC7A5 cells proliferate less than BON-shScramble control cells in both amino acid content conditions, although the effect is greater in low amino acid content media ( $p$ -value  $< 0.05$  and  $< 0.01$ , respectively, Figure 5c).



**Figure 5.** Contribution of LAT-1 (SLC7A5) to cell proliferation of BON tumor cell line. (a) Relative LAT-1 (SLC7A5) mRNA levels in sh-SCR and sh-SLC7A5 BON cells. Data are represented as the mean and error bars represent SEM ( $n = 3$ ,  $*** p < 0.001$ ). (b) Western blot analysis of SLC7A5 and actin protein levels in sh-SCR and sh-SLC7A5 BON cells. (c) BON sh-SCR and sh-SLC7A5 were cultured for 72 h in normal media (100%) or media containing 20% amino acid content. BON cell proliferation does not differ significantly between 100% and 20% amino acid content media. Proliferation of sh-SLC7A5 BON cells is expressed relative to sh-SCR BON cells in both amino acid content conditions. Data are represented as the mean and error bars represent SEM ( $n = 6$ ) \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

### 3. Discussion

Tumor heterogeneity is one of the major impediments in studying GEP-NETs, precluding the detection of common molecular elements that will facilitate more effective diagnostic and therapeutic strategies. One approach to overcome these hurdles is to scrutinize the mechanisms that guarantee the availability of nutrients to tumor cells [36]. This is the first study to examine LAT-1 and GLUT-1 expression and its clinical significance in GEP-NETs. Our data suggest that both markers are highly expressed in pancreatic and GE cancer cells compared to non-malignant cells, and that both carriers could be explored in the future as potential predictive factors of outcomes in patients with a surgically resected GEP-NET.

It has been suggested that LAT-1 may participate in metastasis and several studies have unveiled a correlation of increased LAT-1 expression with metastasis and worse prognosis in bile duct adenocarcinomas, clear renal cell carcinoma, prostate cancer, and gastric cancer [37–40]. Interestingly, we detected that LAT-1 expression was associated with more aggressive tumors that had already metastasized at the time of diagnosis. These results indicate that LAT-1 overexpression may be a potential prognostic factor in GEP-NETs. In this regard, previous studies in pulmonary NETs have shown correlation between LAT-1 expression and tumor aggressiveness [41]. Furthermore, downregulation of LAT-1 expression inhibits gastric cell growth, migration, and invasion [10]. In this work, we have found novel data suggesting that restricting amino acid availability by decreasing LAT-1 expression could reduce cell proliferation in the NET BON cell line. Along this line, previous studies have shown that LAT1 silencing leads to a reduction of in vitro cell proliferation in different

cell human lines, including renal cell carcinoma and colon adenocarcinoma cell lines. In addition, LAT silencing inhibits *in vivo* xenograft formation in mice [11,14,34]. Therefore, we believe that our data are strong evidence of the functional role of LAT in NETs with an impact in an “*in vivo*” biological setting. Based on these findings, LAT-1 inhibition could be considered a potential strategy for metastasis prevention in patients with a more aggressive disease (i.e., grade 3 neuroendocrine tumors), which is usually more dependent on amino acid and glucose metabolism.

Regarding GLUT-1, previous studies have reported several associations between GLUT-1 expression, tumor aggressiveness, and poor prognosis in other malignant neoplasms, including colorectal cancer, pancreatic ductal adenocarcinoma, lung cancer, prostate cancer, and [42–46]. One explanation is the increased utilization of energy and faster cell growth that indirectly promote metastatic behavior. GLUT-1 expression has been proposed in a recent meta-analysis as an independent prognostic marker for cancer in a wide range of tumors [47]. Furthermore, these data suggest that GLUT-1 expression is a potential prognostic marker able to guide treatment decisions. In a recent small study with lung neuroendocrine tumors, GLUT-1 showed a positive predictive value for the diagnosis of these tumors and was a useful tool for classifying pulmonary NETs [48].

Expression of cell glucose and AA transporters in tumor cells has been used for molecular imaging using transporter-specific PET probes. This technique has been used to diagnose location and/or activity of different tumors. Glucose metabolism is predominantly mediated by GLUT-1 transmembrane transporters [49] and represents the molecular basis underlying the use of radiolabeled glucose in FDG-PET. The rationale for using 18F-fluoroDOPA PET imaging is based on the fact that some tumors, including certain GEP-NETs, are able to take up, decarboxylate, and store amino acids and their biogenic amines such as L-DOPA, which is taken up by a LAT transporter [50]. These imaging techniques may be helpful as indirect markers of GLUT-1 (FDG) and LAT-1 (FDOPA) tumor expression. In this regard, GLUT-1 expression correlates with PET-FDG signal in pulmonary NETs [51]. Unfortunately, our cohort did not include enough PET studies to evaluate correlation of PET signal with LAT-1 and/or GLUT-1 expression. This novel approach will likely help optimize patient treatment by improving monitoring of tumor grade staging, indicating the best therapeutic strategy, and monitoring response to therapy [52].

Increasing evidence indicates that tumors are able to use hypoxic stress to their benefit by activating key biochemical and cellular pathways for their progression, survival, and ability to metastasize. In this regard, we have previously reported a relationship of overexpression of angiopoietins, the angiopoietin TIE-2 receptor, and vascular endothelial growth factor (VEGF) with increased risk of metastasis in NETs [53]. Stress/hypoxia may play an important role in cell proliferation by stimulating or inhibiting intracellular pathways, such as HIF, that can modulate gene expression of multiple factors involved in nutrient uptake [54]. In normoxic conditions, the HIF pathway is inhibited, while the HIF2a isoform is activated [11,55]. Given that LAT-1 expression is controlled by HIF2a, this regulation might account for elevated LAT-1 expression, not only in hypoxic areas, but also in oxygenated cells, such as in pVHL-null cells, in which the HIF instability mechanism is disrupted [11,56]. In this context, individuals with non-hereditary (sporadic) pancreatic NETs may display functionally relevant VHL inactivation (haploinsufficiency or other kinds of epigenetic inactivation). This suggests that VHL gene alteration and the consequent effect on hypoxia signaling could condition the development of sporadic pancreatic NETs [26–28]. Interestingly, we found an inverse relationship between LAT-1 and GLUT-1 expression and VHL in GEP-NETs, indicating a possible disruption of the HIF pathway in these tumors.

We are aware that a possible weakness of the study is the lack of an ideal control to compare with the results of neuroendocrine intestinal tumors, due to the cellular heterogeneity of the intestinal crypts and a lower proportion of neuroendocrine cells. However, the control used in our study appears to be adequate, insofar as it included normal cells subjected to identical biological stress and processing to their respective tumor cell sample. The consistency of the results of this intestinal group with the

results obtained in the pancreatic neuroendocrine tumor group provides additional support to the validity of our conclusions.

In this context, we propose that the study of markers of nutrient uptake at the tumor and peritumoral level, specifically LAT-1 and GLUT-1, could provide innovative knowledge regarding the complicated network of interactions in the NET cellular microenvironment. Therefore, the ability to modulate cellular uptake of glucose and AAs by means of GLUT-1 and LAT-1 inhibitors is currently deemed as a promising approach for the development of innovative anticancer therapies, which has thus far led to the discovery of several chemical classes of GLUT-1 and LAT-1 inhibitors. Interestingly, LAT-1 and GLUT-1 inhibiting drugs are currently in the pipeline and hold promise as both direct targets and factors to synergize with adjuvant therapies [57]. This basic knowledge might aid in personalizing drug regimens for these tumors in the future.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Individuals

A retrospective study was performed including consecutive patients with gastrointestinal and pancreatic NETs with available tumor samples from five reference centers in Spain (Hospital Universitario La Princesa, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Hospital Universitario de Alcalá de Henares, Hospital Clínico San Carlos, and Hospital Universitario Gregorio Marañón) between 1995 and 2018. Tumor samples from the same cohort have been previously reported [31]. Briefly, 110 patients with GEP-NETs were studied (62 had gastrointestinal NETs and 48 had pancreatic NETs) (Table 1). All participants were carefully screened for other malignancies and/or genetic disorders. One subject carried an MEN1 (multiple endocrine neoplasia type 1) gene mutation. No other apparent genetic abnormalities were found. A complete work-up including history, physical examination, and hormone levels was performed in all cases and interpreted by expert endocrinologists (M.M., C.B.C., J.C.A., J.A.D., R.G.C., and M.S.N.), classifying all patients according to World Health Organization (WHO) criteria (tumor site and size, angioinvasion, infiltration level, cell proliferation index, immunohistochemical phenotype, and metastases). All tumors were reviewed by the same pathologist (M.A) and were classified according to WHO criteria [58] as G1, G2, and G3 (Table 1). Cell proliferation activity was determined in terms of the Ki-67 index.

Subjects were managed following current recommendations and guidelines [59]. Elective surgery was the first treatment option in all cases and adjuvant therapy with somatostatin analogues was administered if evidence of residual disease was observed (Table 1).

This project was approved by the Internal Ethical Review Committee of the Hospital de La Princesa (Registration number: PI-776) and written informed consent was obtained from all participants prior to inclusion, in accordance with the Declaration of Helsinki.

### 4.2. Tissue Samples

A total of 164 formalin-fixed, paraffin-embedded tissues were evaluated by tissue microarray (TMA). Of them, 116 were tumor samples with pathological diagnosis and 48 were peritumoral. All samples were taken and managed in accordance with local regulations with the approval of the local Institutional Review Board.

### 4.3. Immunohistochemistry (IHC)

Tissue sections were treated by IHC as previously described [31]. Briefly, tissue sections were dewaxed, rehydrated, and washed in phosphate buffered saline 1X (PBS; Lonza, Basel, Switzerland). Epitope retrieval was performed by treating the slides in a PT Link (Dako, Santa Clara, CA, USA) containing an acid or basic solution. Next, endogenous peroxidase was inhibited with a peroxidase-blocking solution (Dako) for 10 min; Fc receptors were then blocked with goat or rabbit serum, as appropriate. Afterwards, sections were immunostained with the following primary

antibodies: anti-Ki-67 (clone MIB-1, Dako), anti VHL (ref: sc135657; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-human CD98 light chain (LAT-1, SLC7A5, ref: AHP1139 Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and anti-glucose transporter GLUT-1 antibody (ref: ab15309; Abcam, Cambridge, UK).

Next, sections were incubated with the proper horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies: goat anti-mouse (Ref: P0447, Dako), goat anti-rabbit (Ref: P0448, Dako), or rabbit anti-goat (Ref: P0449, Dako). Finally, sections were incubated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Dako), counterstained with hematoxylin (Sigma-Aldrich, San Luis, AZ, USA), dehydrated in alcohol, cleared with xylene, and mounted. For each section, the approximate percentage of neuroendocrine (NE) positive cells (proportion score, PS) and staining intensity (intensity score, IS) determined the staining score (IHC score). In the case of pancreatic NETs, tumor cells were compared to neuroendocrine cells (NE) from the islets of Langerhans. In the absence of normal solid NE cell nests as a control for intestinal NET tumors, we used normal intestinal crypts with scattered epithelial neuroendocrine (NE) cells as a normal control for this subgroup. Five different high-power fields in the hot-spot areas of each slide underwent observer-blind examination by four independent observers (AS; MASN, MA, JMC). The proportion of stained cells in each field were scored following criteria as previously described [31]: 1, for 5% stained cells; 2, for 6–25% stained cells; 3, for 26–50% stained cells; and 4, for >50% stained cells. Overall stain intensity was graded as: 0, for negative staining; 1, for light staining; 2, for moderate staining, and 3, for intense staining. The total staining score (TS) for each field resulted from adding the proportion of stained cells score with the staining intensity score (TS = PS + IS). The final TS was the mean of the 5 fields. Tonsil tissue served as positive control for the different antibodies. Tumor expression of the various markers was classified with respect to the median as high (higher than or equal to the median) and low (lower than the median).

Immunostaining of agarose-embedded HEK 293T cells was performed by fixing cells in zinc formaline fixative (Ref: Z2902, Sigma-Aldrich) for 16 h. HEK 293T cells were then embedded in 1% agarose and prepared for paraffin processing. Paraffin slides underwent antigen retrieval by incubation in pH6 citrate buffer with heat induced epitope retrieval (HIER) conditions. Next, endogenous peroxidase was inhibited with 3% hydrogen peroxide for 15 min, followed by incubation with goat serum to block Fc antibody region. Subsequently, sections were immunostained with anti-LAT-1 (CD98 light chain) (Ref: AHP1139, Bio-Rad) followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody: polyclonal goat anti-rabbit HRP (Ref: P0448, Dako). Finally, sections were incubated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Dako), dehydrated in alcohol, cleared with citrus clearing solvent (Ref: 8301 Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and mounted.

#### 4.4. Immunofluorescence

Tissue sections were dewaxed, rehydrated, and washed in PBS 1X (Lonza). To retrieve epitopes, slides were treated in a PT Link (Dako) as described above for IHC. Sections were then incubated for 1 h with a blocking solution consisting of 2% (*w/v*) bovine serum albumin (BSA; Gibco) and 10% (*v/v*) human serum (Sigma-Aldrich) diluted in PBS × X as previously reported [31]. Sections were subsequently incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: anti-CD3 (polyclonal, ref: A0452; Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), anti VHL (ref: sc135657; Santa Cruz Biotechnology), anti-human CD98 (LAT-1, SLC7A5, ref: AHP1139; BioRad, Hercules, CA, USA), anti-glucose transporter GLUT-1 antibody (ref: ab15309; Abcam, Cambridge, UK), and chromogranin A antibody Alexa Fluor 488 (ref: NBP2-33198AF488; Novus Biological, CO, USA). The next day, tissue samples were washed three times for five minutes each with PBS 1X. Tissue sections were then incubated for 30 min with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific) and the appropriate secondary antibodies labeled with a fluorophore: donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647 (Cat. A-31573, Invitrogen, Carlsbad, USA) or donkey anti-mouse Alexa Fluor 555 (Cat. A-31570, Invitrogen). Finally, sections were washed three times for five minutes each with PBS 1X, mounted, and analyzed with a Leica TCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).



#### 4.5. Cells and Reagents

All cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/HIGH GLUCOSE, SH30022.01, HyClone, GE Healthcare, Logan, UT, USA) and Ham's nutrient mixture F1 medium (SH30026FS, HyClone, GE Healthcare) 1:1 supplemented with 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 20 mM HEPES, and 10% fetal bovine serum (FBS, SV30160.03 HyClone, GE Healthcare) as previously described [11]. To prepare media with lower amino acid content, normal DMEM/Ham's F12 medium was diluted with the corresponding volume of amino acid-free DMEM. Amino acid-deprived media were supplemented with 10% dialyzed FBS (10,000 Mwt cut-off; F0392, Sigma-Aldrich).

#### 4.6. Viral Infection

SLC7A5 (sc-62555-V) and control (sc-108080) shRNA lentiviral particles (Santa Cruz) were used to generate stable transfectants sh-SLC7A5 BON cells and their corresponding control sh-SCR BON cells based on our previous work. We took into consideration that pooling siRNAs that target different regions of the target mRNA has been proposed to diminish the off-target effect [60]. Therefore, we have used a commercially available pool of three shRNA constructs against SLC7A5 (sc-62555-V, Santa Cruz Biotechnology Inc.) as our strategy to silence SLC7A5 gene expression in the BON cell line. Lentiviral infection was conducted by seeding HEK293T cells in p60 plates transfected with 1.8 µg of each lentiviral vector 1.14 µg of pCMV-dR8.91 and pMD2.G using lipofectamine 2000 (Invitrogen), as per the manufacturer's instructions. Cell culture supernatants were harvested 48 h following transfection, filtered through a 0.45-µm filter, diluted (1:2) with fresh medium containing 8 µg/mL polybrene (final concentration), and added to BON cells. This step was repeated over the following 2 days.

#### 4.7. Cell Proliferation Analysis

For cell proliferation assays, 75,000 BON cells were seeded per well in 6-well plates. After 72 h, they were trypsinized, collected in the medium, and live cells per well were analyzed with methyl violet and measured by spectrophotometry at 540 nm. For cell proliferation recovery assays, 6 h after seeding, the medium was changed to complete medium or 20% medium and supplemented with dialyzed FBS. Then cells were grown for another 72 h and collected and counted as previously described.

#### 4.8. Western Blot and Antibodies

Western blot was performed using the same methods as previously reported [11], albeit a different antibody for LAT-1 detection was used (cell signaling, #5347). Specifically, cells were lysed in Laemmli buffer. Western blots were performed using 8–12% SDS-polyacrylamide gels and the membranes were probed with rabbit polyclonal antisera raised against LAT-1 (cell signaling, #5347) or β-actin (A3854, Sigma-Aldrich). Immunolabeling was detected by enhanced chemiluminescence (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific) and visualized with a digital luminescent image analyzer (Image Quant LAS400 mini).

#### 4.9. RNA Extraction and qRT-PCR

Total RNA from cells was isolated using Ultraspec and TRIsure (BIO-38032, Bioline). RNA (1 µg) was then reverse-transcribed with Improm-II reverse transcriptase (Promega) and polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed using the Power SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems) in a StepOne Version 2.0 system (Applied Biosystems) [11]. The following primer sets were utilized: human LAT-1 (forward, 5'-GGAACATTGTGCTGGCATTATACA-3'; reverse, 5'-CCTCTGTGACGAAATTCAAGTAATTC-3'), and human 28s (forward, 5'-GGTAGCCAAATGCCTC GTCAT-3'; reverse, 5'-GGATAGTAGGTAGGGACAGTGGGAAT-3'). LAT-1 RNA data were normalized to 28S RNA expression levels. Moreover, LAT-1 and 28S RNA data were obtained using a standard curve for both LAT-1 and 28S. Data were analyzed with Software StepOne version 2.0

(Applied Biosystems, available from: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/technical-resources/software-downloads/StepOne-and-StepOnePlus-Real-Time-PCR-System.html>).

#### 4.10. Statistical Analysis

Quantitative variables are expressed as the median and interquartile range (boxplots), while qualitative variables are presented as relative percentages of samples (histograms) included in contingency tables. Fisher's exact test was applied to compare qualitative variables. Unpaired, two-tailed, Student t-test was used to compare two independent groups and paired Student t-test, to analyze two related samples. One-way ANOVA was employed to compare more than two groups and post-hoc multiple comparisons were made with Tukey's test. Spearman's rho analyses were performed to detect correlations between blood markers and immune markers examined by IHC. Kaplan–Meier analyses were used to assess the effect of the different biomarkers on cohort survival. Stata v. 12.0 (StataCorp. 2011, College Station, TX, USA) for Windows and R version 3.3.2 [61] were used for analyses. Package ggplots2 [62] and corrplot (available from: <https://github.com/taiyun/corrplot>) were used for graphics.  $p$ -values  $< 0.05$  were deemed statistically significant. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 5. Conclusions

We have shown that mechanisms that increase nutrient uptake, such as LAT-1 and GLUT-1, are increased in GEP-NETs, whereas pVHL is decreased in these tumors. Furthermore, tumors with metastases at diagnosis display a higher staining score of LAT-1 and GLUT-1 and a decreased pVHL expression suggesting a possible use of these markers as disease predictors in the future. Finally, functional studies suggest that LAT-1 disruption in NET BON cell line modify in-vitro proliferation capacity. In this context, our data suggest that LAT-1 inhibitors may play a role in the treatment of high-risk patients.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/10/2968/s1>, Figure S1: LAT-1 (SLC7A5) immunodetection by immunohistochemistry and flow cytometry. Figure S2: FACs antibody validation on flow cytometry and immunofluorescence. Figure S3: Unprocessed western blot images of SLC7A5 and actin protein levels in sh-SCR and sh-SLC7A5 BON-1 cells presented in Figure 5b. Densitometry readings and ratio of SLC7A5/Actin of each band. Figure S4: Unprocessed western blot images of actin protein levels in sh-SCR and sh-SLC7A5 BON-1 cells presented in Figure 5b at different exposure levels. Figure S5: Unprocessed western blot images of SLC7A5 and actin protein levels in sh-SCR and sh-SLC7A5 BON-1 cells presented in Figure 5b. 25 to 70 kDa membrane photo.

**Author Contributions:** Conception of the work: M.S.-N., J.A., M.M.; Research design: M.S.-N., J.A., M.M.; M.S.-N., A.B., A.S.-S., R.M.-H., M.A., J.M.C.-T., M.M. performed the experiments; Data analysis: M.S.-N., A.B., A.S.-S., M.M.; Experimental results interpretation: M.S.-N., A.B., A.S.-S., R.M.-H., M.A., J.M.C.-T., J.A., M.M.; Figures made by: M.S.-N., A.B., A.S.-S., J.A., M.M.; Acquisition of clinical data and samples: M.S.-N., E.M.-P., J.L.M.d.N., C.B.-C., J.M.C.-A., J.Á.D., R.G.-C., M.M.; Manuscript draft: M.S.-N., A.B., A.S.-S., R.M.-H., J.A., M.M.; Final manuscript draft: M.S.-N., A.B., A.S.-S., R.M.-H., J.A., M.M. Critical revision of the manuscript for important intellectual content and final manuscript: M.S.-N., A.B., A.S.-S., R.M.-H., M.A., E.M.-P., J.L.M.d.N., J.M.C.-T., C.B.-C., J.M.C.-A., J.Á.D., R.G.-C., J.A., M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the following grants: Proyectos de Investigación en Salud (FIS) PIE13-0041, PI16-02091 and PI19-00584 (funded by Instituto de Salud Carlos III), TIRONET2-CM, B2017/BMD-3724 (funded by Comunidad de Madrid), GETNE G1707 and GCI1901 (funded by Grupo Español de Tumores Neuroendocrinos y Endocrinos) and cofinanced by FEDER funds to M.M. Proyectos de Investigación en Salud (FIS) PI19/01316-FEDER (funded by Instituto de Salud Carlos III), given to J.C.T. Grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2016-76815 and SAF2017-90794-REDT), and Fundació La Marató de TV3 (534/C/2016) ceded to J.A.

**Acknowledgments:** We thank Francisca Molina-Jimenez from the Instituto Universitario Princesa for kindly giving technical assistance with confocal microscopy and Manolo Gómez for English corrections of the manuscript. We also warmly thank all the participants included in the study for their selfless participation. We also thank the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER GCV14/ER/12) for their support.

**Conflicts of Interest:** M.M. and M.S.N. have received speaker's fees from Novartis and Ipsen. The remaining authors have nothing to disclose.



## References

1. Kos-Kudla, B.; Cwikla, J.; Ruchala, M.; Hubalewska-Dydejczyk, A.; Jarzab, B.; Krajewska, J.; Kaminski, G. Current treatment options for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors with a focus on the role of lanreotide. *Contemp. Oncol. (Pozn)* **2017**, *21*, 115–122. [\[CrossRef\]](#)
2. Yao, J.C.; Hassan, M.; Phan, A.; Dagohoy, C.; Leary, C.; Mares, J.E.; Abdalla, E.K.; Fleming, J.B.; Vauthey, J.N.; Rashid, A.; et al. One hundred years after “carcinoid”: Epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3063–3072. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Low, S.K.; Giannis, D.; Bahaie, N.S.; Trong, B.L.H.; Moris, D.; Huy, N.T. Competing Mortality in Patients With Neuroendocrine Tumors. *Am. J. Clin. Oncol.* **2019**, *42*, 668–674. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Pavel, M.; Oberg, K.; Falconi, M.; Krenning, E.; Sundin, A.; Perren, A.; Berruti, A. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
5. Khan, M.S.; Caplin, M.E. The use of biomarkers in neuroendocrine tumours. *Frontline Gastroenterol.* **2013**, *4*, 175–181. [\[CrossRef\]](#)
6. Takeuchi, K.; Ogata, S.; Nakanishi, K.; Ozeki, Y.; Hiroi, S.; Tominaga, S.; Aida, S.; Matsuo, H.; Sakata, T.; Kawai, T. LAT1 expression in non-small-cell lung carcinomas: Analyses by semiquantitative reverse transcription-PCR (237 cases) and immunohistochemistry (295 cases). *Lung Cancer* **2010**, *68*, 58–65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Xu, M.; Sakamoto, S.; Matsushima, J.; Kimura, T.; Ueda, T.; Mizokami, A.; Kanai, Y.; Ichikawa, T. Up-Regulation of LAT1 during Antiandrogen Therapy Contributes to Progression in Prostate Cancer Cells. *J. Urol.* **2016**, *195*, 1588–1597. [\[CrossRef\]](#)
8. Shimizu, A.; Kaira, K.; Kato, M.; Yasuda, M.; Takahashi, A.; Tominaga, H.; Oriuchi, N.; Nagamori, S.; Kanai, Y.; Oyama, T.; et al. Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* **2015**, *25*, 399–405. [\[CrossRef\]](#)
9. Shennan, D.B.; Thomson, J. Inhibition of system L (LAT1/CD98hc) reduces the growth of cultured human breast cancer cells. *Oncol. Rep.* **2008**, *20*, 885–889. [\[CrossRef\]](#)
10. Wang, J.; Chen, X.; Su, L.; Li, P.; Liu, B.; Zhu, Z. LAT-1 functions as a promotor in gastric cancer associated with clinicopathologic features. *Biomed. Pharm.* **2013**, *67*, 693–699. [\[CrossRef\]](#)
11. Elorza, A.; Soro-Arnáiz, I.; Meléndez-Rodríguez, F.; Rodríguez-Vaello, V.; Marsboom, G.; de Cárcer, G.; Acosta-Iborra, B.; Albacete-Albacete, L.; Ordóñez, A.; Serrano-Oviedo, L.; et al. HIF2 $\alpha$  acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5. *Mol. Cell* **2012**, *48*, 681–691. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Ichinoe, M.; Yanagisawa, N.; Mikami, T.; Hana, K.; Nakada, N.; Endou, H.; Okayasu, I.; Murakumo, Y. L-Type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in lymph node metastasis of gastric carcinoma: Its correlation with size of metastatic lesion and Ki-67 labeling. *Pathol. Res. Pract.* **2015**, *211*, 533–538. [\[CrossRef\]](#)
13. Kaira, K.; Oriuchi, N.; Imai, H.; Shimizu, K.; Yanagitani, N.; Sunaga, N.; Hisada, T.; Tanaka, S.; Ishizuka, T.; Kanai, Y.; et al. L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 2380–2386. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Hafliger, P.; Charles, R.P. The L-Type Amino Acid Transporter LAT1—An Emerging Target in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2428. [\[CrossRef\]](#)
15. Nakada, N.; Mikami, T.; Hana, K.; Ichinoe, M.; Yanagisawa, N.; Yoshida, T.; Endou, H.; Okayasu, I. Unique and selective expression of L-amino acid transporter 1 in human tissue as well as being an aspect of oncofetal protein. *Histol. Histopathol.* **2014**, *29*, 217–227. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Yang, H.; Zhong, J.T.; Zhou, S.H.; Han, H.M. Roles of GLUT-1 and HK-II expression in the biological behavior of head and neck cancer. *Oncotarget* **2019**, *10*, 3066–3083. [\[CrossRef\]](#)
17. Koh, Y.W.; Lee, S.J.; Park, S.Y. Differential expression and prognostic significance of GLUT1 according to histologic type of non-small-cell lung cancer and its association with volume-dependent parameters. *Lung Cancer* **2017**, *104*, 31–37. [\[CrossRef\]](#)
18. Airley, R.E.; Mobasher, A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: Novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* **2007**, *53*, 233–256. [\[CrossRef\]](#)
19. Medina, R.A.; Owen, G.I. Glucose transporters: Expression, regulation and cancer. *Biol. Res.* **2002**, *35*, 9–26. [\[CrossRef\]](#)

20. Amann, T.; Hellerbrand, C. GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Expert. Opin. Ther. Targets* **2009**, *13*, 1411–1427. [[CrossRef](#)]
21. Fujino, M.; Aishima, S.; Shindo, K.; Oda, Y.; Morimatsu, K.; Tsutsumi, K.; Otsuka, T.; Tanaka, M. Expression of glucose transporter-1 is correlated with hypoxia-inducible factor 1alpha and malignant potential in pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 3337–3343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Binderup, T.; Knigge, U.P.; Federspiel, B.; Sommer, P.; Hasselby, J.P.; Loft, A.; Kjaer, A. Gene Expression of Glucose Transporter 1 (GLUT1), Hexokinase 1 and Hexokinase 2 in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors: Correlation with F-18-fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography and Cellular Proliferation. *Diagnostics (Basel)* **2013**, *3*, 372–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nagano, T.; Ishii, G.; Nagai, K.; Ito, T.; Kawase, A.; Takahashi, K.; Nishimura, Y.; Nishiwaki, Y.; Ochiai, A. Structural and biological properties of a papillary component generating a micropapillary component in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* **2010**, *67*, 282–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Richard, S.; Graff, J.; Lindau, J.; Resche, F. Von Hippel-Lindau disease. *Lancet* **2004**, *363*, 1231–1234. [[CrossRef](#)]
25. Perigny, M.; Hammel, P.; Corcos, O.; Larochelle, O.; Giraud, S.; Richard, S.; Sauvanet, A.; Belghiti, J.; Ruzsniowski, P.; Bedossa, P.; et al. Pancreatic endocrine microadenomatosis in patients with von Hippel-Lindau disease: Characterization by VHL/HIF pathway proteins expression. *Am. J. Surg. Pathol.* **2009**, *33*, 739–748. [[CrossRef](#)]
26. Schmitt, A.M.; Schmid, S.; Rudolph, T.; Anlauf, M.; Prinz, C.; Kloppel, G.; Moch, H.; Heitz, P.U.; Komminoth, P.; Perren, A. VHL inactivation is an important pathway for the development of malignant sporadic pancreatic endocrine tumors. *Endocr. Relat. Cancer* **2009**, *16*, 1219–1227. [[CrossRef](#)]
27. Crona, J.; Skogseid, B. GEP-NETS UPDATE: Genetics of neuroendocrine tumors. *Eur. J. Endocrinol.* **2016**, *174*, R275–R290. [[CrossRef](#)]
28. Scarpa, A.; Chang, D.K.; Nones, K.; Corbo, V.; Patch, A.M.; Bailey, P.; Lawlor, R.T.; Johns, A.L.; Miller, D.K.; Mafficini, A.; et al. Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature* **2017**, *543*, 65–71. [[CrossRef](#)]
29. Estrella, V.; Chen, T.; Lloyd, M.; Wojtkowiak, J.; Cornell, H.H.; Ibrahim-Hashim, A.; Bailey, K.; Balagurunathan, Y.; Rothberg, J.M.; Sloane, B.F.; et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1524–1535. [[CrossRef](#)]
30. Sun, C.; Zhao, C.; Li, S.; Wang, J.; Zhou, Q.; Sun, J.; Ding, Q.; Liu, M.; Ding, G. EZH2 Expression is increased in BAP1-mutant renal clear cell carcinoma and is related to poor prognosis. *J. Cancer* **2018**, *9*, 3787–3796. [[CrossRef](#)]
31. Sampedro-Nunez, M.; Serrano-Somavilla, A.; Adrados, M.; Cameselle-Teijeiro, J.M.; Blanco-Carrera, C.; Cabezas-Agricola, J.M.; Martinez-Hernandez, R.; Martin-Perez, E.; Munoz de Nova, J.L.; Diaz, J.A.; et al. Analysis of expression of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint system and its prognostic impact in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 17812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Nicklin, P.; Bergman, P.; Zhang, B.; Triantafellow, E.; Wang, H.; Nyfeler, B.; Yang, H.; Hild, M.; Kung, C.; Wilson, C.; et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **2009**, *136*, 521–534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Evers, B.M.; Townsend, C.M.; Upp, J.R.; Allen, E.; Hurlbut, S.C.; Kim, S.W.; Rajaraman, S.; Singh, P.; Reubi, J.C.; Thompson, J.C. Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology* **1991**, *101*, 303–311. [[CrossRef](#)]
34. Cormerais, Y.; Giuliano, S.; LeFloch, R.; Front, B.; Durivault, J.; Tambutte, E.; Massard, P.A.; de la Ballina, L.R.; Endou, H.; Wempe, M.F.; et al. Genetic Disruption of the Multifunctional CD98/LAT1 Complex Demonstrates the Key Role of Essential Amino Acid Transport in the Control of mTORC1 and Tumor Growth. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 4481–4492. [[CrossRef](#)]
35. Marjon, P.L.; Bobrovnikova-Marjon, E.V.; Abcouwer, S.F. Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cancer* **2004**, *3*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Semenza, G.L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **2010**, *29*, 625–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Yanagisawa, N.; Hana, K.; Nakada, N.; Ichinoe, M.; Koizumi, W.; Endou, H.; Okayasu, I.; Murakumo, Y. High expression of L-type amino acid transporter 1 as a prognostic marker in bile duct adenocarcinomas. *Cancer Med.* **2014**, *3*, 1246–1255. [[CrossRef](#)]

38. Betsunoh, H.; Fukuda, T.; Anzai, N.; Nishihara, D.; Mizuno, T.; Yuki, H.; Masuda, A.; Yamaguchi, Y.; Abe, H.; Yashi, M.; et al. Increased expression of system large amino acid transporter (LAT)-1 mRNA is associated with invasive potential and unfavorable prognosis of human clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 509. [[CrossRef](#)]
39. Yanagisawa, N.; Satoh, T.; Hana, K.; Ichinoe, M.; Nakada, N.; Endou, H.; Okayasu, I.; Murakumo, Y. L-amino acid transporter 1 may be a prognostic marker for local progression of prostatic cancer under expectant management. *Cancer Biomark.* **2015**, *15*, 365–374. [[CrossRef](#)]
40. Ding, K.; Tan, S.; Huang, X.; Wang, X.; Li, X.; Fan, R.; Zhu, Y.; Lobie, P.E.; Wang, W.; Wu, Z. GSE1 predicts poor survival outcome in gastric cancer patients by SLC7A5 enhancement of tumor growth and metastasis. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 3949–3964. [[CrossRef](#)]
41. Kaira, K.; Oriuchi, N.; Imai, H.; Shimizu, K.; Yanagitani, N.; Sunaga, N.; Hisada, T.; Kawashima, O.; Iijima, H.; Ishizuka, T.; et al. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in neuroendocrine tumors of the lung. *Pathol. Res. Pract.* **2008**, *204*, 553–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. GabAllah, G.M.K.; El-Din Habib, M.S.; Soliman, S.E.; Kasemy, Z.A.; Gohar, S.F. Validity and clinical impact of glucose transporter 1 expression in colorectal cancer. *Saudi. J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 348–356. [[CrossRef](#)]
43. Kurahara, H.; Maemura, K.; Mataka, Y.; Sakoda, M.; Iino, S.; Kawasaki, Y.; Arigami, T.; Mori, S.; Kijima, Y.; Ueno, S.; et al. Significance of Glucose Transporter Type 1 (GLUT-1) Expression in the Therapeutic Strategy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **2018**, *25*, 1432–1439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zhang, B.; Xie, Z.; Li, B. The clinicopathologic impacts and prognostic significance of GLUT1 expression in patients with lung cancer: A meta-analysis. *Gene* **2019**, *689*, 76–83. [[CrossRef](#)]
45. Gasinska, A.; Jaszczynski, J.; Rychlik, U.; Luczynska, E.; Pogodzinski, M.; Palaczynski, M. Prognostic Significance of Serum PSA Level and Telomerase, VEGF and GLUT-1 Protein Expression for the Biochemical Recurrence in Prostate Cancer Patients after Radical Prostatectomy. *Pathol. Oncol. Res.* **2019**. [[CrossRef](#)]
46. Dura, M.; Nemejcova, K.; Jaksa, R.; Bartu, M.; Kodet, O.; Ticha, I.; Michalkova, R.; Dundr, P. Expression of Glut-1 in Malignant Melanoma and Melanocytic Nevi: An Immunohistochemical Study of 400 Cases. *Pathol. Oncol. Res.* **2019**, *25*, 361–368. [[CrossRef](#)]
47. Zhao, Z.X.; Lu, L.W.; Qiu, J.; Li, Q.P.; Xu, F.; Liu, B.J.; Dong, J.C.; Gong, W.Y. Glucose transporter-1 as an independent prognostic marker for cancer: A meta-analysis. *Oncotarget* **2018**, *9*, 2728–2738. [[CrossRef](#)]
48. Benzerdjeb, N.; Berna, P.; Sevestre, H. GLUT1: A novel tool reflecting proliferative activity of lung neuroendocrine tumors? *Pathol. Int.* **2017**, *67*, 32–36. [[CrossRef](#)]
49. Adekola, K.; Rosen, S.T.; Shanmugam, M. Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr. Opin. Oncol.* **2012**, *24*, 650–654. [[CrossRef](#)]
50. Jager, P.L.; Chirakal, R.; Marriott, C.J.; Brouwers, A.H.; Koopmans, K.P.; Gulenchyn, K.Y. 6-L-18F-fluorodihydroxyphenylalanine PET in neuroendocrine tumors: Basic aspects and emerging clinical applications. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 573–586. [[CrossRef](#)]
51. Kaira, K.; Murakami, H.; Endo, M.; Ohde, Y.; Naito, T.; Kondo, H.; Nakajima, T.; Yamamoto, N.; Takahashi, T. Biological correlation of (1)(8)F-FDG uptake on PET in pulmonary neuroendocrine tumors. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 4219–4228.
52. Kandasamy, P.; Gyimesi, G.; Kanai, Y.; Hediger, M.A. Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43*, 752–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Figueroa-Vega, N.; Díaz, A.; Adrados, M.; Alvarez-Escolá, C.; Paniagua, A.; Aragonés, J.; Martín-Pérez, E.; Leskela, S.; Moreno-Otero, R.; González-Amaro, R.; et al. The association of the angiopoietin/Tie-2 system with the development of metastasis and leukocyte migration in neuroendocrine tumors. *Endocr. Relat. Cancer* **2010**, *17*, 897–908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sakurai, T.; Kudo, M. Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology* **2011**, *81* (Suppl. 1), 24–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Zoncu, R.; Efeyan, A.; Sabatini, D.M. mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 21–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Shen, C.; Beroukhi, R.; Schumacher, S.E.; Zhou, J.; Chang, M.; Signoretti, S.; Kaelin, W.G., Jr. Genetic and functional studies implicate HIF1alpha as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discov.* **2011**, *1*, 222–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Wang, Q.; Holst, J. L-type amino acid transport and cancer: Targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *5*, 1281–1294. [[PubMed](#)]

58. Chai, S.M.; Brown, I.S.; Kumarasinghe, M.P. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: Selected pathology review and molecular updates. *Histopathology* **2018**, *72*, 153–167. [[CrossRef](#)]
59. Oberg, K.; Couvelard, A.; Delle Fave, G.; Gross, D.; Grossman, A.; Jensen, R.T.; Pape, U.F.; Perren, A.; Rindi, G.; Ruszniewski, P.; et al. ENETS Consensus Guidelines for Standard of Care in Neuroendocrine Tumours: Biochemical Markers. *Neuroendocrinology* **2017**, *105*, 201–211. [[CrossRef](#)]
60. Kittler, R.; Surendranath, V.; Heninger, A.K.; Slabicki, M.; Theis, M.; Putz, G.; Franke, K.; Caldarelli, A.; Grabner, H.; Kozak, K.; et al. Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 337–344. [[CrossRef](#)]
61. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2018. Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 4 April 2019).
62. Wickham, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer: New York, NY, USA, 2009.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## Review

# Role of the HIF oxygen sensing pathway in cell defense and proliferation through the control of amino acid metabolism

Antonio Bouthelier<sup>a</sup>, Julián Aragonés<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Research Unit, Hospital of Santa Cristina, Research Institute Princesa (IP), Autonomous University of Madrid, Madrid 28009, Spain

<sup>b</sup> CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, Carlos III Health Institute, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Hypoxia-inducible factors  
HIF  
Amino acid metabolism  
mTORC1  
Redox stress  
Proliferation

## ABSTRACT

Cell responses to reduced oxygen supply (hypoxia) are largely mediated by hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). The pathophysiological role of the HIF pathway is driven by its ability to potentiate key biological processes as part of the adaptation to hypoxia, such as erythropoiesis and angiogenesis. Moreover, the role of HIF signaling in the reprogramming of cell metabolism is also critical to understand the role of these transcription factors in health and disease. In this regard, HIFs reprogram oxidative metabolism of glucose and fatty acids, offering a molecular mechanism by which the HIF pathway can help cells become more tolerant of redox stress during hypoxic/ischemic episodes. However, the way in which HIFs influence amino acid metabolism and its pathophysiology consequences have been less well explored. Here we review recent studies about the role of the HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms in amino acid metabolism, which provides insight to better understand how these factors can influence cell autonomous proliferation and cellular tolerance to hypoxia.

## 1. Introduction

Hypoxia-inducible factors (HIFs) are fundamental to adapt cells and tissues to the lack of oxygen commonly found in numerous pathological scenarios, including anemia, tissue ischemia, solid tumor growth or high altitude exposure, as well as in physiological scenarios like embryonic development [1]. HIFs are composed of an alpha subunit (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  or HIF3 $\alpha$ ) and a beta subunit (HIF $\beta$ ), also referred to as the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). The regulation of heterodimeric HIFs is exerted by controlling the stability of the HIF $\alpha$  subunits, while the HIF $\beta$  subunit remains expressed constitutively irrespective of the oxygen available. The stability of the HIF $\alpha$  subunits is controlled by the HIF prolyl-hydroxylase (PHD) enzymes (PHD1, PHD2 and PHD3), which are 2-oxoglutarate dependent Fe<sup>2+</sup>-dioxygenases [2,3]. When oxygen is available in normoxic conditions, PHDs use oxygen to hydroxylate two conserved proline residues in the HIF $\alpha$  subunits, and these hydroxylated prolyl residues are recognized by the Von Hippel Lindau (VHL)/E3 ubiquitin ligase complex that targets the HIF $\alpha$  subunits for proteasomal degradation [4,5]. However, in hypoxic conditions there is not enough oxygen for PHDs to hydroxylate HIF $\alpha$  subunits, precluding their recognition by Vhl and stabilizing these HIF $\alpha$  subunits. Consequently, HIF $\alpha$  subunits can heterodimerize with HIF $\beta$  subunits during hypoxia and bind to DNA at the hypoxia response elements (HREs) in target genes, driving a HIF-

dependent transcriptional program [6,7]. However, these HIF $\alpha$  subunits may also be constitutively stabilized in normoxia if the activity of VHL and PHDs is impaired, either upon: (i) Vhl inactivation as in human clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), a condition characterized by the loss of Vhl and the ensuing constitutive stabilization of HIF; or (ii) PHD1–3 inactivation, as studied in some of the cellular and mouse models discussed below. The activity of HIF $\alpha$  subunits is also controlled by the asparaginyl hydroxylase, FIH (Factor Inhibiting HIF). In normoxic conditions FIH hydroxylates a conserved asparagine residue at the C-terminal transactivation domain of HIF $\alpha$  subunits, which prevents the recruitment of p300/CBP transcriptional co-activators [8,9]. However, FIH cannot hydroxylate HIF $\alpha$  subunits when oxygen becomes limited, leading to p300/CBP recruitment and complete HIF $\alpha$  activation. Therefore, the simultaneous inhibition of PHDs and FIH in hypoxia is required for full activation of the HIF pathway. Furthermore, it has also been proposed that the activity of these PHD Fe(II)/2-OG-dependent dioxygenases is also compromised by redox stress [10,11], or by key metabolites of the glycolytic or tricarboxylic acid (TCA) cycle that can affect the 2-oxoglutarate-dependent PHDs activity [12,13]. Finally, several players have been identified that can interact directly or indirectly with HIF $\alpha$  subunits (e.g., protein kinases, hsp90, p53), which has proposed to be modify their stability and activity, suggesting that the central PHD-HIF $\alpha$  pathway is tightly regulated [14].

Two of the well-recognized biological processes that are controlled

\* Corresponding author at: Research Unit, Hospital of Santa Cristina, Research Institute Princesa (IP), Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain.

E-mail address: [julian.aragones@uam.es](mailto:julian.aragones@uam.es) (J. Aragonés).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118733>

Received 17 January 2020; Received in revised form 15 April 2020; Accepted 26 April 2020

Available online 13 May 2020

0167-4889/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



by HIFs are erythropoiesis and angiogenesis, which facilitate oxygen delivery to hypoxic tissues. This central response mediated by HIFs involves the upregulation of two primary HIF responsive genes, erythropoietin (EPO) and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A). However, another key function of the HIF-oxygen sensing pathway is to reprogram cellular glucose/fatty acid metabolism. In this line, HIF1 $\alpha$  induces key glycolytic genes, including lactate dehydrogenase (LDH-A), favoring lactate production and ATP generation in an oxygen-independent manner [15]. Moreover, HIFs can induce the expression of pyruvate dehydrogenase kinases (PDK-1, 3 and 4) [16–19], which inhibit the pyruvate dehydrogenase complex and thereby reduce glucose-dependent replenishment of the TCA cycle. Moreover, HIFs specifically repress: (i) key enzymes involved in fatty acid oxidation and in the mitochondrial TCA cycle; (ii) the activity of mitochondrial complexes; and (iii) key regulators of the mitochondrial content [15]. All these metabolic actions result in reduced mitochondrial glucose and fatty acid-dependent oxygen consumption in hypoxic conditions. This HIF-dependent dampening of mitochondrial activity not only saves oxygen in hypoxic conditions but also, it reduces the formation of toxic mitochondrial reactive oxygen species (ROS) [16,17]. This anti-oxidant response explains the ability of HIFs to elicit cellular tolerance to hypoxia and redox stress that for example takes place upon ischemia-reperfusion [17,18].

Most of the information about the role of the HIF pathway in cell metabolism is related to glucose and fatty acid metabolism. However, the role of the HIF-oxygen pathway in amino acid metabolism is less well-studied, even though recent studies have revealed that is also key to understand the role of HIFs in pathophysiology. Hence, in this review we will describe these recent studies unveiling the role of the HIF pathway in the uptake and biosynthesis of different amino acids, as well as in the expression of key amino acid carriers and amino acid producing enzymes. In this line, we will highlight the relevance of amino acid metabolism to mediate the impact of the HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms in cellular tolerance to hypoxia and in cell autonomous proliferation in different biological settings.

## 2. The role of the HIF pathway in glutamine-dependent glutathione biosynthesis and glutamate metabolism

After entering the cell, glutamine is first converted into glutamate by cellular glutaminase (GLS), of which three isoforms have been identified: GLS1, GLS2, and the GLS1 variant GAC [20]. Intracellular glutamate can subsequently be converted to other key metabolites, such as  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG) that replenishes the TCA cycle (see below) [21–24]. The process of glutamine conversion into glutamate, and subsequently to  $\alpha$ -KG, is termed glutaminolysis (Fig. 1). Alternatively, glutamate can also be converted into other metabolite precursors of glutathione, which protects the cell against redox stress (Fig. 1 and see also below) [25,26].

### 2.1. - the HIF pathway induces glutamine-dependent intracellular glutamate accumulation

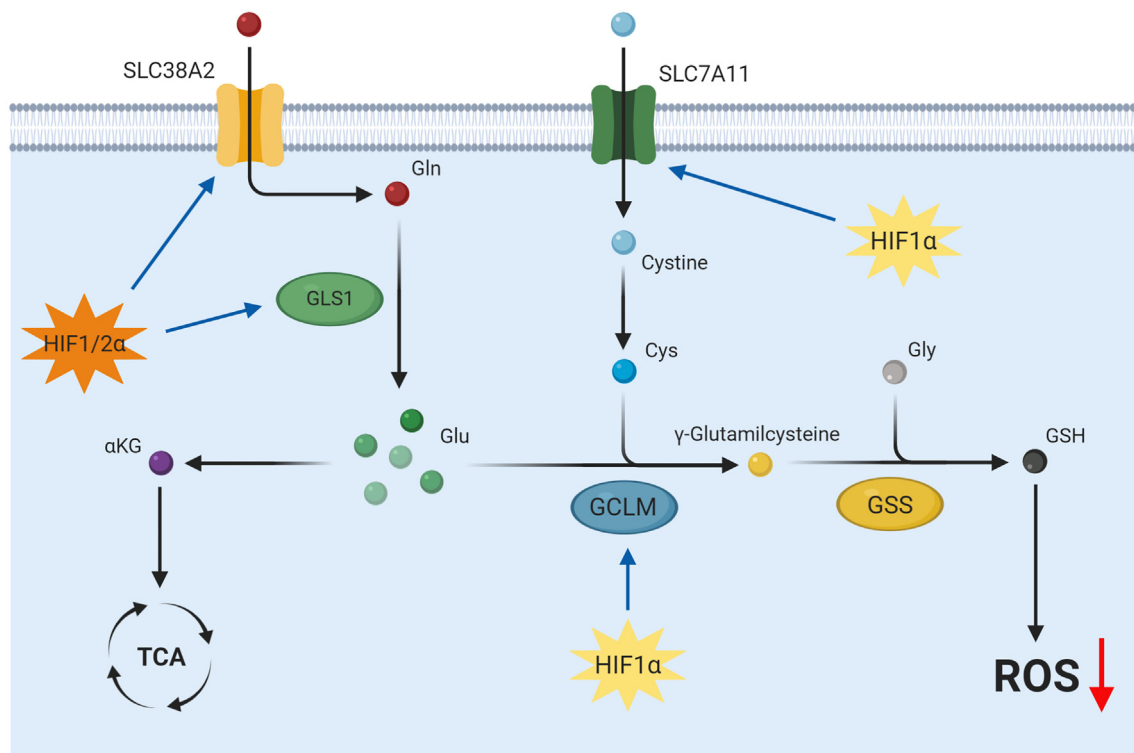
Recent studies have shown that HIF1 $\alpha$  activation leads to intracellular glutamate accumulation in different cellular settings. Indeed, constitutive HIF1 $\alpha$  activation in PHD2-deficient murine periosteum-derived cells elevates the intracellular glutamate content [25]. HIF1 $\alpha$  also increases intracellular glutamate in both hypoxic and Vhl-deficient CD8+ T lymphocytes [27]. More recently, we showed that restoring HIF1 $\alpha$  in tumor cells lacking HIF1 $\alpha$  enhances intracellular glutamate accumulation [28]. Accordingly, an analyses of  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine metabolic flux showed an enrichment of  $^{13}\text{C}_5$ -labeled glutamate in PHD2-deficient or hypoxic cells [25,29,30]. Similar data was obtained when HIF1 $\alpha$  was constitutively activated in Vhl-deficient renal cell carcinoma cells [28]. Therefore, intracellular glutamate accumulation can occur in different cellular settings upon HIF1 $\alpha$  activation.

This glutamate accumulation was shown to be a consequence of increased glutamine uptake upon HIF activation (Fig. 1). In this regard, PHD2 inactivation or exposure to hypoxia leads to increased cellular glutamine uptake in different cellular models [25,29]. Along similar lines, the amino acid carrier SLC38A2 (SNAT2) that is involved in cellular glutamine uptake is a HIF1 $\alpha$ - and HIF2 $\alpha$ -responsive gene in breast cancer cell lines [31], and a binding site for both HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  has been identified upstream of the SLC38A2 promoter [31]. In addition, another glutamine carrier - SLC1A5 - is controlled by the HIF2 $\alpha$  isoform in pancreatic and cervix cancer cell lines [32,33] (Table 1). These data suggest that increased glutamate uptake and its subsequent accumulation in hypoxic cells can be driven by both HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms through plasma membrane glutamine carriers like SLC38A2 and SLC1A5. Moreover, HIF2 $\alpha$  has the ability to not only induce the expression of the glutamine carrier SLC1A5 in pancreatic cancer cell lines but also, an SLC1A5 variant responsible for mitochondrial glutamine uptake [33] (see below) (Fig. 3). This SLC1A5 variant is transcribed from an alternative transcription initiation site and specifically targeted to the inner mitochondrial membrane [33]. At the transcriptional level, HIF2 $\alpha$  binds to a HRE within the promoter of the SLC1A5 variant, which controls its gene expression in response to hypoxia [33]. These data raise the question as to whether HIF activation also promotes glutamate accumulation in the mitochondrial compartment. In this regard, a very recent study analyzing the  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine-dependent metabolic flux in hypoxic cells showed glutamate enrichment to be faster in mitochondria [30].

Glutamate accumulation upon HIF pathway activation can not only be explained by elevated expression of plasma glutamine carriers but also, by the ability of HIF to induce the expression of GLS1, accelerating the conversion of intracellular glutamine into glutamate (Fig. 1) [25,34]. In this regard, HIF1 binds to an HRE located in the 5' promoter region of the GLS1 gene indicating that GLS1 is a primary HIF responsive gene [34]. An independent study showed that the HIF2 $\alpha$  isoform can also control GLS1 expression in cervical cancer cells [32]. It is important to note that GLS1 is located in both the cytosolic and mitochondrial compartments, and thus, mitochondrial GLS1 activity can also contribute to mitochondrial glutamate accumulation discussed above. Collectively, these studies suggest that HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  activation potentiates glutamine uptake, which can subsequently be converted into glutamate in the cytosolic and mitochondrial compartments. This HIF-dependent response can be exerted by plasma membrane and mitochondrial glutamine carriers (e.g., the SLC38A2, SLC1A5 and SLC1A5 variant), the expression of which is primarily controlled by HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  isoforms (Table 1). Moreover, HIF-dependent GLS1 upregulation also contributes to glutamate accumulation in hypoxic cells, possibly in both the cytosolic and mitochondrial compartments (Table 1). Thus, compartmentalization of HIF-dependent glutamine metabolism warrants further investigation in different cellular models and biological settings upon HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  activation.

### 2.2. HIF pathway and glutamate-dependent glutathione biosynthesis

Why do hypoxic cells favor glutamine-dependent intracellular glutamate accumulation? Intracellular glutamate can be used for glutathione biosynthesis, in its reduced GSH form, which serves as a cellular defense against redox stress through its conversion to glutathione disulfide, the oxidized GSSG form [26] (Fig. 1). In a first step, glutamate is fused with cysteine to form  $\gamma$ -glutamylcysteine through the activity of glutamyl cysteine ligase (GCL), an enzyme composed of a catalytic subunit (GCLC) and a modifier subunit (GCLM). In a second step, glycine is added to  $\gamma$ -glutamylcysteine by the enzyme glutathione synthase (GSS) to form glutathione [35]. Importantly, PHD2-deficient murine periosteum-derived cells show increased glutamine-dependent glutathione biosynthesis suggesting that HIF1 $\alpha$ -dependent glutamate elevation contributes to increased intracellular glutathione levels [25]. Indeed,  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine-dependent metabolic flux analysis showed an



**Fig. 1.** HIF-dependent intracellular glutamate accumulation and glutathione biosynthesis. The figure shows how intracellular glutamate accumulates upon HIF1 or HIF2 activation due to the increase in the SLC38A2 glutamine carrier and glutaminase GLS1 expression. Moreover, additional actions executed by HIF1 $\alpha$  are indicated that may control glutathione biosynthesis, such as the increased expression of the SLC7A11 cystine transporter gene and the GCLM subunit of glutamyl cysteine ligase. Finally,  $\gamma$ -glutamylcysteine and glycine are fused by glutathione synthetase (GSS) to generate glutathione, which is central to neutralize cellular redox stress. Gln, Glutamine; Glu, Glutamate;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -ketoglutarate; Cys, Cysteine; Gly, Glycine; GSH, Reduced glutathione.

enrichment of  $^{13}\text{C}_5$ -labeled glutathione in this PHD2-deficient cells [25]. Furthermore, HIF1 $\alpha$ -dependent glutathione accumulation was also found in other cellular models, such as breast cancer cell lines [36,37]. Glutathione accumulation in response to HIF1 $\alpha$  activation can be explained simply as a direct consequence of the glutamate accumulation described above. In this regard, GLS1 overexpression has been shown to be sufficient to increase the reduced: oxidized glutathione ratio [25].

In addition, HIF1 $\alpha$  can exert other actions that may also contribute to drive glutathione biosynthesis in its reduced form (GSH). Chemotherapy induces HIF1 $\alpha$  activity in breast cancer cell lines, leading to glutathione biosynthesis by inducing the expression of the SLC7A11 (xCT) carrier for cystine subsequently converted into cysteine required for glutathione biosynthesis [36]. This study shows that GCLM subunit of GCL required for the generation of the glutathione precursor,  $\gamma$ -glutamylcysteine (see above) is also induced upon HIF1 $\alpha$  activation [36] (Fig. 1). Moreover, this study identified a HIF1 $\alpha$  binding site in the third intron of SLC7A11 and in the 5'-flanking region of GCLM [36] (Table 1). Furthermore, increased surface - but not total - SLC7A11 expression and elevated cystine uptake were also found in hypoxic glioma cells [38]. However, SLC7A11 upregulation has not been observed in other cellular models [10,39], probably reflecting how each cell type can execute specific gene expression programs to guarantee glutathione biosynthesis in response to hypoxia or alternatively that SLC7A11 elevation is more clearly manifested when its plasma membrane expression is analyzed. Moreover, the HIF pathway can also help to counteract redox stress by restoring reduced glutathione (GSH) from oxidized glutathione (GS-SG), which requires the activation of glycolytic shunt pathways leading to NADPH production. Firstly, HIF1 $\alpha$  induces key enzymes involved in glycogen accumulation in different cellular models [40–42]. In parallel, hypoxia can also induce the glycogen phosphorylase (PYGL), which further cleaves accumulated

glycogen to release glucose-6-phosphate that enters the pentose phosphate pathway (PPP) [40]. This glycogen-dependent PPP pathway leads to the generation of the NADPH required for the glutathione reductase activity that converts GSSG into GSH [40]. However, PYGL is not a HIF target gene and therefore hypoxia-dependent PYGL expression is not a primary response executed by HIFs [40]. A second glycolytic shunt pathway required for NADPH production is the serine synthesis pathway (SSP), followed by one-carbon (folate cycle) metabolism. Along similar lines, a study on breast cancer cells showed HIF1 $\alpha$  induces the expression of phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) and other key enzymes in this pathway such as phosphoserine aminotransferase-1 (PSAT1) and phosphoserine phosphatase (PSPH) [43]. Key reactions in this pathway produce NADPH and thus, they contribute to the restoration of intracellular GSH levels and redox homeostasis in hypoxic cells [43]. However, it should be noted that HIF1 $\alpha$  does not alter PSAT1 in other cellular models [28], reflecting that some elements involved in amino acid metabolism are regulated in cell type-dependent manner.

This glutamine-dependent glutathione biosynthesis triggered by HIF activation may represent the means by which HIF induces tolerance to redox stress in different biological settings. In this regard, HIF1 $\alpha$ -dependent glutathione biosynthesis upon PHD2 inactivation improves cell survival and enhances bone regeneration by counteracting redox stress in murine periosteum-derived cells [25]. Accordingly, these PHD2-deficient cells are more resistant to oxidizing agents as a consequence of the elevated reduced: oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio driven by HIF1 $\alpha$ -dependent GLS1 induction. Conversely, GLS1 overexpression produces cellular tolerance to redox stress by increasing the glutamine-dependent contribution to glutathione biosynthesis [25]. Furthermore, the mitochondrial glutamine uptake induced through the HIF2 $\alpha$ -SLC1A5 variant pathway (described above) produces cellular tolerance to redox stress by controlling GSH biosynthesis [33]. The antioxidant



**Table 1**

Key players involved in amino acid metabolism regulated by the HIF pathway. Table 1 summarizes the amino acid carriers or enzymes involved in amino acid biosynthesis whose expression is induced or repressed by the HIF1 or HIF2 isoform. The table also shows whether an HRE has been proposed to be involved in this regulation, as well as the biological setting in which this regulation was identified. RCC signifies renal carcinoma cells. The following cell lines are included in the table: UCDmel-ΔH, a melanoma cell line; SKOV3, an ovarian cancer cell line; HeLa, a cervical cancer cell line; G55 and D54-MG, glioblastoma cell lines; Hep3B, a hepatocellular carcinoma cell line, SiHa, a cervical cancer cell line; and Neuro2A, a murine neuroblastoma cell line.

GENE	Regulation by HIF	HRE	CELLS/TISSUE/TUMOR TYPE
<b>GLS1</b>	Induced (HIF1) <sup>25,34</sup> Induced (HIF2) <sup>32</sup>	+	Murine periosteum-derived cells <sup>25</sup> Human colorectal carcinoma cells <sup>34</sup> Human colorectal cancer samples <sup>34</sup> SiHa <sup>32</sup>
<b>GOT1</b>	Repressed (HIF1) <sup>28,99</sup>	-	RCC, UCDMel-ΔH, SKOV3, HeLa, G55 <sup>28</sup> Vhl-deficient human renal cell carcinoma samples <sup>28,99</sup>
<b>GOT2</b>	Repressed (HIF1) <sup>28,99</sup>	-	RCC, UCDMel-ΔH, SKOV3, HeLa, G55 <sup>28</sup> Vhl-deficient human renal cell carcinoma samples <sup>28,99</sup>
<b>PHGDH</b>	Induced (HIF1, HIF2) <sup>43</sup>	-	Human breast cancer cells <sup>43</sup>
<b>PSAT1</b>	Induced (HIF1, HIF2) <sup>43</sup> Not altered <sup>28</sup>	-	Human breast cancer cells <sup>43</sup> 786-O, UCDMel-ΔH <sup>28</sup>
<b>PSPH</b>	Induced (HIF1, HIF2) <sup>43</sup>	-	Human breast cancer cells <sup>43</sup>
<b>SLC1A1</b>	Induced (HIF1, HIF2) <sup>31,39</sup>	-	Hep3B, RCC, human breast cancer cells <sup>31,39</sup>
<b>SLC1A3</b>	Induced (HIF1, HIF2) <sup>39</sup>	+	Hep3B, RCC, human breast cancer cells <sup>39</sup>
<b>SLC1A5</b>	Induced (HIF2) <sup>32,33</sup>	+	SiHa <sup>32</sup> Human pancreatic cancer cells <sup>33</sup>
<b>SLC1A5_var</b>	Induced (HIF2) <sup>33</sup>	+	Human pancreatic cancer cells <sup>33</sup>
<b>SLC38A2</b>	Induced (HIF1, HIF2) <sup>31</sup>	+	Human breast cancer cells <sup>31</sup>
<b>SLC7A11</b>	Induced (HIF1) <sup>36,38</sup> Not altered <sup>39,10</sup>	+	Human breast cancer cells <sup>36</sup> D54-MG <sup>38</sup> Hep3B, RCC <sup>39</sup> Human breast cancer cells <sup>10</sup>
<b>SLC7A5</b>	Induced (HIF2) <sup>80,83,92,93,32,31</sup> Induced (HIF1, HIF2) <sup>94</sup>	+	RCC <sup>80</sup> Vhl-deficient mouse tissue <sup>80</sup> Vhl-deficient human renal cell carcinoma samples <sup>80,92,93</sup> Neuro2A <sup>83</sup> SiHa <sup>32</sup> Human breast cancer cells <sup>31</sup> Human glioblastoma cells <sup>94</sup>

properties of this HIF2α-SLC1A5 variant pathway are relevant for resistance to pro-oxidant chemotherapy agents, such as that of pancreatic cancer cells to gemcitabine [33]. Moreover, hypoxia-induced glutathione biosynthesis driven by SLC7A11 and the GCLM subunit of γ-GCS helps sustain the stem cell phenotype of breast cancer cells [36]. At the molecular level, HIF1α-induced glutathione accumulation was proposed to chelate intracellular copper and inhibit MEK1 (MAP kinase/Erk kinase1) activity, which acts as a repressor of FOXO3 transcription factor. Therefore, hypoxia facilitates FOXO3 transcriptional activity, which in turn induces the expression of pluripotent factors required for the maintenance of the breast cancer stem cell phenotype [36]. Finally, silencing hypoxia-dependent glycolytic shunt pathways that produce NADPH and restore glutathione in its reduced form (GSH) (see above) also exacerbates the production of ROS. Indeed, PYGL

silencing elevates the production of mitochondrial superoxide production in hypoxic U87 and MCF-7 cells [40]. In addition, PHGDH silencing also increases mitochondrial ROS and it impairs the hypoxic survival of breast cancer cells [43].

It should also be considered that as well as oxygen, the supply of amino acids to solid tumors may also become limited as a consequence of insufficient perfusion. Therefore, the HIF-dependent expression of glutamine carriers might not only ensure glutamine supply to counteract redox stress but also, it may possibly favor tumor cell protein synthesis and proliferation (see below). In this regard, SLC38A2 inhibition sensitizes the MCF7 breast cancer cell line to glutamine deprivation, whereas SLC38A2 overexpression favors cell growth when the glutamine supply is compromised [31]. These responses might be explained, to some extent, by the ability of SLC38A2 to drive cellular

tolerance by facilitating glutamine-dependent glutathione biosynthesis, especially when the glutamine supply is compromised.

### 2.3. HIF1 $\alpha$ and glutamate secretion

As well as glutamate contributing to glutathione biosynthesis, intracellular glutamate can be also released into the extracellular milieu. Elevated glutamate secretion was evident in hypoxic human hepatocellular carcinoma Hep3B cells [39], suggesting that not all the glutamate accumulated in response to HIF1 $\alpha$  activation is used to generate glutathione. It was proposed that glutamate efflux in hypoxic cells takes place through the glutamate carriers SLC1A1 and SLC1A3 in Hep3B cells [39] (Table 1). Moreover, SLC1A1 expression is consistently induced in different breast cancer cell lines under hypoxic conditions [31] (Table 1). Glutamate release from hypoxic cells has been shown to stimulate the proliferation of Hep3B cells, which is mediated by glutamate binding to its receptors Gria2 and Gria3 to stimulate MEK-ERK signaling [39]. However, in many other cell lines HIF1 $\alpha$  represses proliferation (see below). Therefore, it is conceivable that in other cellular models glutamate released by hypoxic cells might only promote proliferation in distant cells outside of the hypoxic areas or alternatively might initiate other non-proliferative autocrine or paracrine signals. In this line, it has been recently shown that extracellular glutamate can lead to activation of HIF1 $\alpha$  in breast cancer cells. In this regard, glutamate inhibits SLC7A11, leading to PHD2 redox inactivation and HIF1 $\alpha$  accumulation [10]. Therefore, glutamate released following HIF1 $\alpha$  activation could potentially spread HIF1 $\alpha$  activation to the surrounding normoxic cells. Thus, the biological role of glutamate efflux from hypoxic cells warrants further investigation in order to explore the biological role of metabolic and paracrine communication between hypoxic and surrounding normoxic cells in solid tumors or other biological settings.

## 3. Glutamine-dependent TCA cycle activity and cell autonomous proliferation upon HIF1 $\alpha$ activation

### 3.1. HIF1 $\alpha$ reduces glutamine oxidation

In addition to glutathione biosynthesis and release to the extracellular milieu, the glutamine-dependent glutamate that accumulates upon HIF activation can also be converted into cytosolic or mitochondrial  $\alpha$ -KG through the activity of transaminases or glutamine dehydrogenase [44] (Fig. 2). Glutamine-derived mitochondrial  $\alpha$ -KG can be further oxidized in the TCA cycle, thereby sustaining glutamine-dependent oxygen consumption. A key biological action mediated by HIF is the slowing down of mitochondrial oxidative metabolism, which confers cellular tolerance to hypoxia by saving oxygen and preventing the formation of mitochondrial ROS, as mentioned above. In this context, HIF1 $\alpha$  not only attenuates glucose oxidation (see above) but also, glutamine oxidation and therefore glutamine-dependent oxygen consumption [28,45] (Fig. 2). The first step in  $\alpha$ -KG oxidation within the TCA cycle is the conversion of  $\alpha$ -KG to succinyl-CoA by the  $\alpha$ -KG dehydrogenase ( $\alpha$ KGDH) complex, a step that is specifically attenuated by HIF1 $\alpha$  activation (Fig. 2) [45]. In this regard, HIF1 $\alpha$  promotes SIAH2-targeted ubiquitination and proteolysis of OGDH2 the 48 kDa splice variant of the E1 subunit of the  $\alpha$ -KG dehydrogenase  $\alpha$ KGDH complex [45]. Furthermore, we found that HIF1 $\alpha$  represses further steps in the TCA cycle by reducing the expression of the succinate dehydrogenase subunit A (SDH-A), the TCA enzyme that directly converts succinate to fumarate and is a subunit of mitochondrial complex II [28] (Fig. 2). Moreover HIF1 $\alpha$  can also decrease the expression of the mitochondrial SDH-B subunit [46]. Therefore, HIF1 $\alpha$ -dependent repression of glutamine oxidation and glutamine-dependent oxygen consumption may be a consequence of the simultaneous repression of  $\alpha$ -KG dehydrogenase and SDH activities, which limits the biosynthesis of TCA metabolites generated after the SDH reaction. Consequently, further citrate

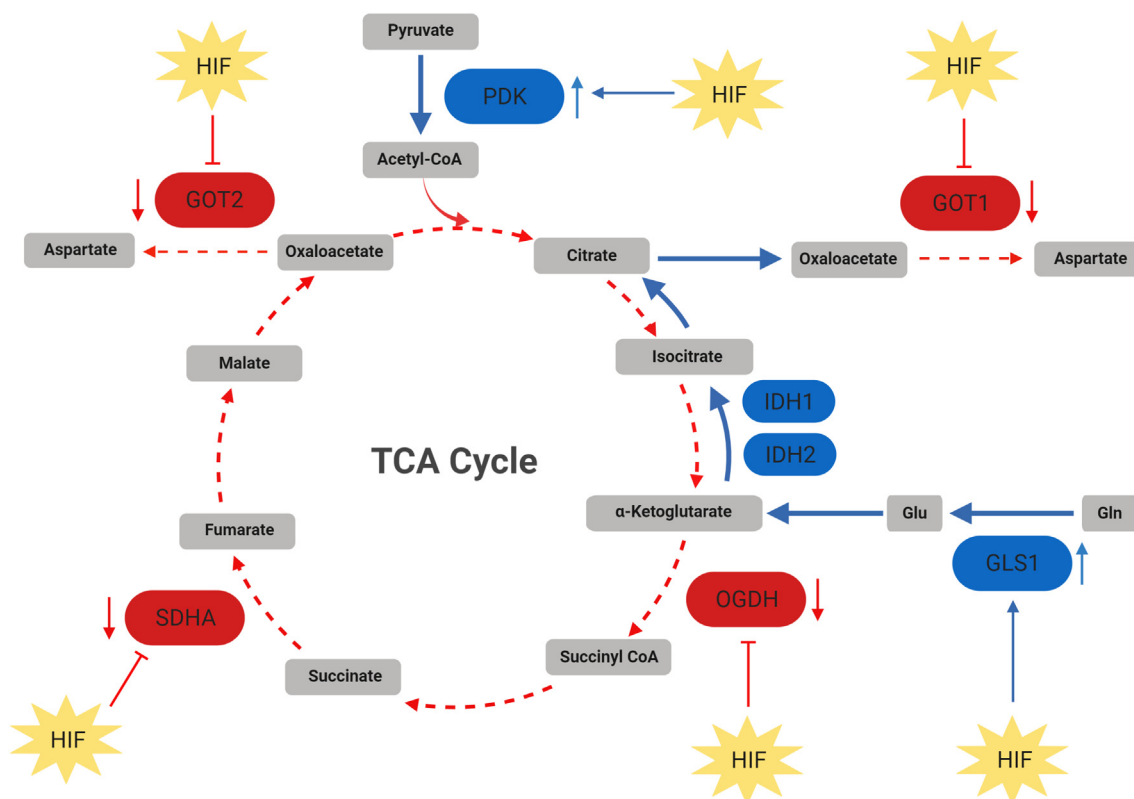
biosynthesis through the glutamine oxidative pathway of the TCA is also markedly reduced upon HIF1 $\alpha$  activation [47]. This inhibition of glutamine-dependent citrate biosynthesis through the glutamine oxidative pathway occurs along with the inhibition of glucose-dependent citrate biosynthesis by PDKs, as described above [16,17]. Therefore, HIF1 $\alpha$  activation provokes the profound suppression of citrate biosynthesis through both glutamine and glucose oxidative pathways.

### 3.2. Role of HIF1 $\alpha$ in the glutamine reductive pathway

HIF1 $\alpha$  activation does not favor glutamine-derived  $\alpha$ -KG oxidation, although it does not prevent the conversion of  $\alpha$ -KG to citrate through reductive carboxylation [48–52,54]. This reductive carboxylation pathway involves the conversion of  $\alpha$ -KG to isocitrate through cytosolic and mitochondrial isocitrate dehydrogenase-1 and -2 (IDH1 and IDH2) respectively, followed by the conversion of isocitrate to citrate through cytosolic and mitochondrial aconitase-1 and -2 (ACO1 and ACO2) respectively (Fig. 2) [30,48,49]. The shift to reductive glutamine metabolism upon HIF1 $\alpha$  activation can be measured by the enrichment of M + 5 citrate (generated through glutamine reductive carboxylation) relative to M + 4 citrate (generated through glutamine oxidation) in <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamine labeled cells. Indeed, an increased M + 5 to M + 4 citrate ratio upon HIF1 $\alpha$  activation is indicative of a shift from oxidative to reductive glutamine metabolism [53]. <sup>13</sup>C-glutamine labeling also revealed that the shift to glutamine reductive carboxylation may also be manifested *in vivo*, such as that in Vhl-deficient xenografts characterized by constitutive activation of HIF pathway [51]. Further studies suggested that this shift may just be a consequence of the suppression of glutamine oxidation and not necessarily due to an increase in the net flux of reductive carboxylation. In this regard, net reductive carboxylation flux through IDH1 and IDH2 are not induced in hypoxic HeLa cells [30]. Citrate generated by reductive carboxylation can be further cleaved by ATP citrate lyase to produce cytosolic acetyl-CoA, which can be used as a source for fatty acid biosynthesis in hypoxic conditions [48–52,55]. An additional study in hypoxic A549 cells suggest that IDH flux may not be a net contributor to acetyl-CoA production for fatty acid biosynthesis in hypoxic conditions and that fatty acids supply can be taken from the extracellular milieu [55]. Furthermore, while HIF1 $\alpha$  activity augments ACO2 expression in prostate cancer cells, it reduces IDH1 expression in osteosarcoma cells [56,57]. Hence, the glutamine reductive metabolism may be better preserved (not necessarily induced) than the glutamine oxidative pathway in hypoxic cells. This scenario can also explain how total citrate levels decline in response to hypoxia or in Vhl-deficient cells [48,51]. As such, the glutamine reductive carboxylation pathway might be not sufficient to compensate for the remarkable decline in citrate biosynthesis through the oxidative glucose and glutamine pathways.

### 3.3. HIF1 $\alpha$ -dependent TCA activity and cell autonomous proliferation

HIF1 $\alpha$  can act as a repressor of cell proliferation in different tumor and non-tumor scenarios [58–60]. This has been widely studied in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), which is characterized by VHL inactivation and therefore, by constitutive activation of HIF1 $\alpha$  in normoxic conditions [59]. In this regard, a large proportion of ccRCCs harbor homozygous DNA deletions in the genomic region encompassing the HIF1 $\alpha$  locus, resulting in a loss of HIF1 $\alpha$  activity [61]. HIF1 $\alpha$ -dependent inhibition of cell proliferation can be attributed to the ability of HIF1 $\alpha$  to counteract the activity of c-myc through several mechanisms [59,62], and through its influence on DNA replication mediated by the minichromosome maintenance (MCM) complex [60]. However, the anti-proliferative potential of HIF1 $\alpha$  may also depend on its ability to compromise the glutamine and glucose-dependent TCA oxidative pathways. Accordingly, TCA metabolites are necessary for anabolic pathways that lead to nucleic acid or fatty acid biosynthesis, which is required to ensure cell duplication and cell autonomous proliferation.



**Fig. 2.** HIF-dependent TCA cycle reprogramming. The figure shows the metabolic activities controlled by the HIF pathway, such as the induction of pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs) to attenuate glucose oxidation. Similarly, HIF pathway reduces succinate dehydrogenase (SDH) and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase ( $\alpha$ KGDH) activities to restrain glucose, fatty acid and glutamine oxidative pathways. Moreover glutaminase (GLS1) is induced upon HIF activation to drive glutamate accumulation as detailed in the Fig. 1. The figure also shows that IDH1/2-dependent glutamine reductive metabolism is sustained upon HIF activation (solid blue line), whereas oxidative pathways (dashed red line) are attenuated. Finally, the figure also shows the HIF1-dependent inhibition of aspartate biosynthesis through glutamic-oxaloacetic transaminases 1 and 2 (GOT1 and 2). The blue and red small arrows represent upregulation and downregulation respectively and the HIF isoform involved in each of these metabolic actions are detailed in the text.

For example, mitochondrial oxaloacetate is directly converted to aspartate, a precursor for nucleotide biosynthesis [22,24,63].

Our own studies showed that HIF1 $\alpha$  not only represses key TCA enzymes like SDH-A, which can limit the mitochondrial oxaloacetate content required for aspartate biogenesis, but also, it reduces the expression of mitochondrial glutamic-oxaloacetic transaminase-2 (GOT2) that converts oxaloacetate into aspartate [28]. It was recently shown that citrate generated by glutamine reductive carboxylation can be converted to aspartate involving GOT1 [22,24]. GOT1 acts in the malate-aspartate shuttle to convert aspartate into oxaloacetate, although it can also act in the opposite direction whereby oxaloacetate serves to synthesize aspartate in the cytoplasm through reductive carboxylation pathway [22,24]. HIF1 $\alpha$  also inhibits GOT1 protein expression, thereby repressing the glutamine-dependent reductive carboxylation step involved in the biosynthesis of cytosolic aspartate [28] (Fig. 2). Importantly, aspartate supplementation can relieve the HIF1 $\alpha$  dependent suppression of cell proliferation [28]. Thus, simultaneous HIF1 $\alpha$ -dependent suppression of the GOT2-dependent oxidative (mitochondrial) and GOT1-dependent reductive (cytosolic) aspartate biosynthesis provides a molecular basis for the anti-proliferative potential of HIF1 $\alpha$  [28]. In this line human ccRCC samples characterized by constitutive HIF1 $\alpha$  activation show a remarkable suppression of both GOT1 and GOT2 protein levels as well as aspartate levels [28,64]. Furthermore, two other key studies showed that hypoxia markedly reduces intracellular aspartate levels, which underlie the hypoxia-dependent suppression of cell proliferation [65,66]. As mentioned above, HIF1 $\alpha$  suppresses TCA activity not only by inhibiting the oxidative glutamine pathways but also, by repressing glucose oxidation. Indeed, other studies have shown that HIF1 $\alpha$ -dependent attenuation of pyruvate entry

into the TCA cycle underlies the anti-proliferative potential of HIF1 $\alpha$  in T cells and chondrocytes [67,68]. Accordingly, exposing cells to the PDK inhibitor dichloroacetic acid (DCA) counteracts the anti-proliferative potential of HIF1 $\alpha$  [68]. All these studies suggest that suppression of the TCA cycle and thus, that of TCA-dependent anabolic pathways, along with the impact on c-myc or on the DNA replication machinery (see above) provides molecular basis to understand the anti-proliferative potential of HIF1 $\alpha$ .

Finally, it should be noted that the conversion of glutamine to  $\alpha$ -KG involves two steps in which glutamine is deaminated. Firstly, glutamine is converted to glutamate, releasing nitrogen (amide group) that is used for the synthesis of nucleotide precursors like dihydroorotate and orotate. The ensuing conversion of glutamate to  $\alpha$ -KG also releases nitrogen (amine group), either in the form of ammonia ( $\text{NH}_4^+$ ) or that is used by transaminases to produce amino acids like aspartate (which also acts as a nucleotide precursor, see above). The nitrogen released during glutamine deamination in hypoxia was recently associated with dihydroorotate and orotate accumulation, coupled to a reduction in the levels of its downstream nucleotide uridine monophosphate (UMP) [29]. Indeed, this dihydroorotate is released to the extracellular medium [29]. Aspartate is required to produce dihydroorotate and orotate, but the accumulation of these nucleotide precursors takes place even though hypoxia suppresses the intracellular aspartate levels. This study suggest that hypoxia-dependent decline in intracellular aspartate could be a consequence not only of its reduced biosynthesis (see above) but also, of its efficient conversion to dihydroorotate and orotate in hypoxic cells [29]. Therefore, these data suggest that glutamine carbon and nitrogen are metabolized in a coordinated manner in hypoxic cells.

### 3.4. The role of HIF1 $\alpha$ -dependent $\alpha$ -KG metabolism and collagen biosynthesis

Another transcriptional response dependent on the HIF pathway is the induction of key collagen modifying enzymes upon HIF1 $\alpha$  activation, such as collagen prolyl hydroxylases (P4HA1 and P4HA2), lysine hydroxylases (PLOD1 and PLOD2) and lysyl oxidase (LOX) [68–71]. Proline hydroxylation enhances the stability of collagen triple helices and lysine modifications enhance their crosslinking [72]. Importantly, these prolyl and lysine hydroxylases require  $\alpha$ -KG and thus, glutamine-derived  $\alpha$ -KG generated upon HIF activation can be used for proline and lysine hydroxylation [68]. In this regard, PHD2-deficient chondrocytes have enhanced glutamine-derived  $\alpha$ -KG biosynthesis, which facilitates collagen maturation in hypoxic cells [68]. However, an enhancement of glutamine-derived  $\alpha$ -KG biosynthesis upon HIF1 $\alpha$  activation has not been observed in other cellular settings [28], suggesting that this use of accumulated  $\alpha$ -KG might be favored in cells in which collagen biosynthesis is particularly relevant.

### 4. The HIF2 $\alpha$ pathway, amino acid-dependent mTORC1 activity and cell autonomous proliferation

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a serine/threonine kinase that plays a central role in cell growth and proliferation, and that responds to amino acid availability, the energy status of the cell, as well as to growth factor signaling [73]. An initial study in murine embryonic fibroblasts revealed that HIF1 $\alpha$  markedly suppresses mTORC1 activity by inducing the expression of Redd1 (regulated in development and DNA damage responses-1) [74]. mTORC1 is activated by the small GTPase Rheb, which is inhibited by the GTPase-activating tuberous sclerosis complex (TSC1/TSC2) [75,76]. REDD1 has been proposed to act by directly binding to and sequestering 14–3-3 proteins away from TSC2, leading to TSC2-dependent inhibition of mTORC1 [77]. Furthermore, another HIF1 $\alpha$ -dependent gene, bNIP3, has also been implicated in hypoxia-dependent mTORC1 inhibition, provoking a decrease in RHEB-GTP [78]. In addition to HIF-dependent mechanisms, other essential HIF-independent pathways involving AMP-activated protein kinase (AMPK) have been shown to repress mTORC1 during hypoxia [79].

However, mTORC1 is not inhibited by HIF activation in some biological settings. Indeed, HIF activation produces mTORC1 activation in Vhl-deficient in ccRCC [80,81], the hypoxic carotid body [82], the bronchial epithelium [80] and other hypoxic scenarios [83,84]. Several studies have associated mTORC1 activation with HIF2 $\alpha$  activity [80,82]. Accordingly, HIF2 $\alpha$  acts as an oncoprotein in Vhl-deficient ccRCCs, inducing the constitutive mTORC1 activation required for the progression and proliferation of these tumors [80]. Moreover, our own studies showed that constitutive HIF2 $\alpha$  activation is responsible for this elevated mTORC1 activity in ccRCCs [80], providing an explanation for the activity of the HIF2 $\alpha$  isoform as an oncoprotein in these carcinomas [59,80,85,87] (see below). Importantly, the biological role of the HIF2 $\alpha$ -mTORC1 pathway is not only relevant in tumor cells but also, in physiological responses to atmospheric hypoxia. In this regard, HIF2 $\alpha$ -driven mTORC1 activation is required to sustain the proliferation of cells expressing tyrosine hydroxylase (TH) in the carotid body and thus, for ventilatory acclimatization to hypoxia [82]. Moreover, HIF2 $\alpha$  driven mTORC1 activation has been found in the bronchial epithelium upon exposure to hypoxia, which occurs in parallel to marked HIF2 $\alpha$ -dependent bronchial epithelium proliferation in response to hypoxia [86]. The physiological role of this pulmonary epithelium hyperproliferation and its participation in airway adaptation to hypoxia warrants further investigation.

The mechanisms by which HIF2 $\alpha$  can activate mTORC1 involve the participation of the branched-chain amino acid transporter SLC7A5 (Fig. 3). SLC7A5 is involved in the uptake of leucine, a key amino acid required to sustain mTORC1 activity [88]. In this line constitutive

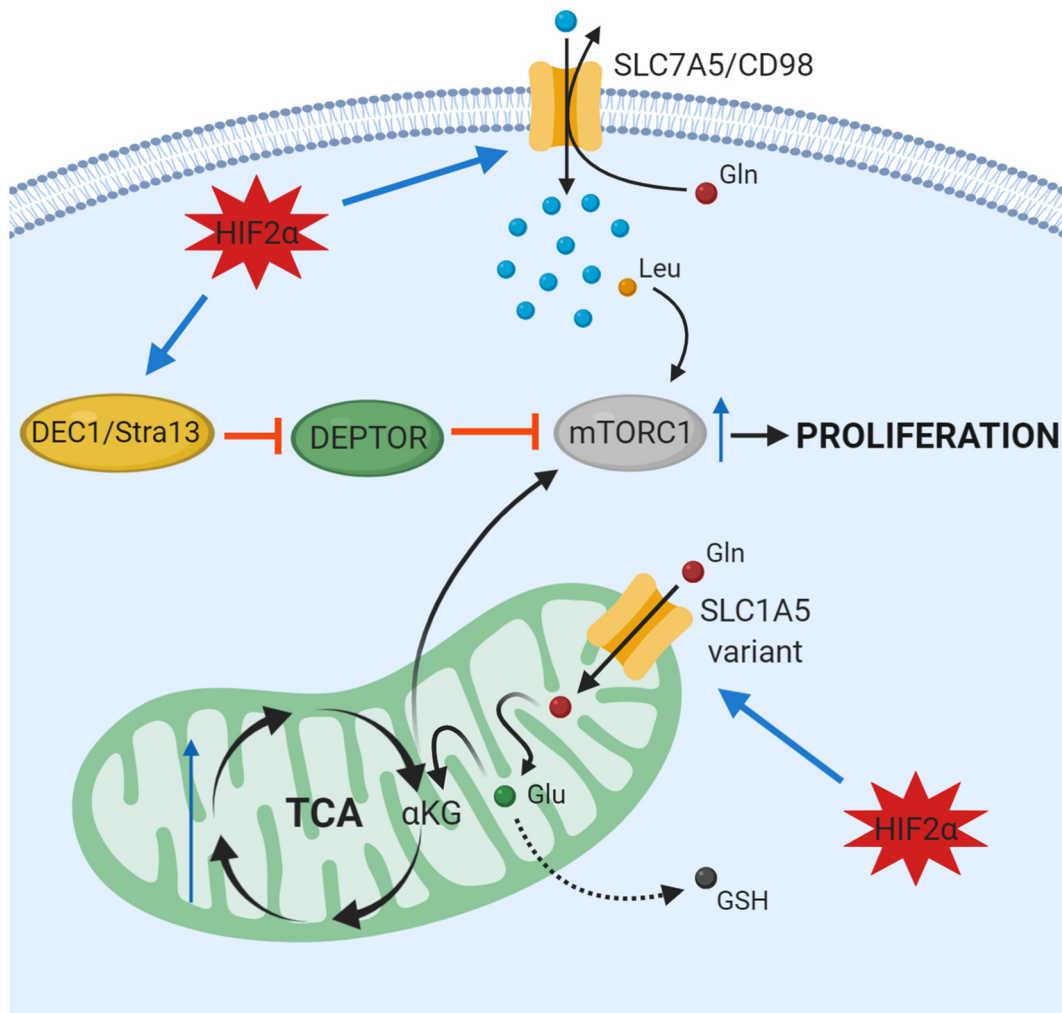
HIF2 $\alpha$  activity induces SLC7A5 expression in Vhl-deficient ccRCC, which leads to mTORC1 activation in these cells [80]. In addition, SLC7A5 expression favors mTORC1 activation and cell proliferation, preferentially when cells are confronted with more limited amino acid availability [80,89,90]. Amino acid supply is presumably lower in those cells located in the inner core of solid tumors, and possibly even under certain physiological conditions [91]. Therefore, it seems that cell culture under low amino acid conditions in vitro can better mimic conditions in vivo. As such, these conditions are necessary to reveal the biological impact of the HIF2 $\alpha$ -SLC7A5 pathway in mTORC1 activation and cell proliferation. Importantly, increased SLC7A5 expression has not only been found in cultures of Vhl-deficient renal cell carcinoma cells in vitro but also in VHL-deficient ccRCC human samples relative to a healthy kidney [80,92,93] (see below). Interestingly, this HIF2 $\alpha$ -SLC7A5 pathway has been confirmed in other biological settings, such as neuroblastoma cells [83] or cervical cancer cells [32]. Moreover, SLC7A5 expression is consistently induced in a panel of different breast cancer cell lines exposed to hypoxia [31]. In addition hypoxia induces SLC7A5 in glioblastoma cells not only through HIF2 $\alpha$  but also involving HIF1 $\alpha$  isoform [94] suggesting that some cell types can also use HIF1 $\alpha$  for SLC7A5 expression. Finally, HIF2 $\alpha$ -dependent SLC7A5 expression was found in other non-neoplastic scenarios, such as in lung tissue [80]. In addition, a recent study further confirmed the ability of HIF2 $\alpha$  to enhance mTORC1 activity in Vhl-deficient ccRCC, revealing an additional mechanism [81] (Fig. 3). At the molecular level, the mTOR inhibitor DEP domain-containing mTOR-interacting protein (DEPTOR) is suppressed upon HIF activation in Vhl-deficient ccRCC cells [81]. Interestingly, this HIF-dependent DEPTOR suppression is indirect and it is exerted by the HIF-dependent transcriptional repressor DEC1 (also named BHLHe40, Stra13) [81]. This study shows that not only HIF2 $\alpha$  but also HIF1 $\alpha$  can suppress DEPTOR activity and potentiate mTORC1, suggesting that the ability of HIF1 $\alpha$  to repress mTORC1 activity is not manifested in Vhl-deficient renal cell carcinoma [81]. Paradoxically, HIF2 $\alpha$  also increases the expression of REDD1 in Vhl-deficient renal cell carcinoma cells [95]. As described above, REDD1 can repress mTORC1, although HIF2 $\alpha$ -dependent mTORC1 activation through SLC7A5 and the DEC1 pathway overrides the inhibitory potential of REDD1 in ccRCC [74]. It is likely that elevated REDD1 in ccRCC could limit full mTORC1 activation, although this restriction is not potent enough to limit HIF2 $\alpha$  dependent mTORC1 activation. Alternatively, it must be borne in mind that HIF2 $\alpha$  might also override the anti-mTORC1 activity of REDD1 in other scenarios in which HIF2 $\alpha$  drives cell proliferation, such as in the carotid body or bronchial epithelium (see above).

As described previously, HIF2 $\alpha$  but not HIF1 $\alpha$  induces the expression of the glutamine carrier SLC1A5 in pancreatic cancer cell lines, as well as that of the SLC1A5 variant involved in mitochondrial glutamine uptake and cell proliferation [33]. Glutamine uptake is relevant for glutamine-dependent mTORC1 activation through  $\alpha$ -KG generation by glutaminolysis [96]. In other cellular models, SLC1A5 acts in concert with SLC7A5 to facilitate amino acid-dependent mTORC1 activation [97]. Importantly, silencing the mitochondrial SLC1A5 variant represses glutamine-dependent  $\alpha$ -KG biosynthesis and reduces mTORC1 activity. Therefore, HIF2 $\alpha$  could also activate mTORC1 through amino acid-dependent mechanisms involving the SLC7A5 and SLC1A5 carriers, together with the repression of DEPTOR via DEC1. It is possible that all these mechanisms act in concert to ensure HIF2 $\alpha$ -dependent proliferative responses, not only in Vhl-deficient renal cell carcinoma but also, in the carotid body or bronchial epithelium.

### 5. Conclusions and perspectives

As described in this review, the HIF-oxygen pathway is emerging as a regulator of glucose and fatty acid metabolism but also, of amino acid metabolism. Several independent studies have shown that activation of the HIF pathway favors glutamine uptake and the ensuing glutathione biosynthesis, which confers cellular tolerance to hypoxia and redox





**Fig. 3.** HIF2 $\alpha$ -dependent mTORC1 activation and cell proliferation. The figure represents those targets controlled directly by HIF2 $\alpha$  linked to mTORC1 activation, such as the SLC7A5 (LAT1) amino acid carrier as well as the transcriptional repressor DEC1/Stra13, which in turn inhibits DEPTOR and potentiates mTORC1 activity. HIF2 $\alpha$  also increases the expression of a mitochondrial SLC1A5 variant, which favors the uptake of glutamine into the mitochondria to promote glutathione biosynthesis, TCA cycle replenishment and mTORC1 activation. Gln, Glutamine; Glu, Glutamate; Leu, Leucine;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -ketoglutarate; GSH, Reduced glutathione.

stress. Moreover, the anti-proliferative potential of HIF1 $\alpha$ , as well as the proliferative properties of the HIF2 $\alpha$  isoform, may be exerted through their specific effects on amino acid metabolism. In this regard, HIF1 $\alpha$  compromises cell autonomous proliferation by reducing TCA-dependent anabolic pathways such as aspartate biosynthesis required for cell replication. In this context, the relative impact of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  on the repression of glucose and glutamine oxidative pathways warrants further study, especially in those cellular scenarios where HIF2 $\alpha$  favors cell proliferation. It might be interesting to consider whether in these scenarios HIF2 $\alpha$  rather than HIF1 $\alpha$  could promote the glucose or glutamine-dependent TCA oxidative pathway, thereby sustaining cell autonomous proliferation and ensuring the activity of the anabolic pathways required for cell division.

It is also important to consider that the information presented here helps to understand the metabolic pathways that tumor cells can execute when confined in hypoxic areas. In particular, this information may be most relevant to define the metabolic basis underlying the progression of Vhl-deficient ccRCC driven by constitutive HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  activation. As mentioned above, both HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  are involved in ccRCC initiation, yet HIF1 $\alpha$  expression is lost in 30–40% of overt ccRCCs. This is consistent with the ability of HIF1 $\alpha$  to act as a tumor suppressor whereas HIF2 $\alpha$  acts as an oncoprotein in ccRCCs [59,61]. Some of the metabolic changes described here have also been confirmed in human ccRCC samples, such as elevated glutathione

content [64], reduced glucose oxidation [98], low intracellular aspartate content [64], reduced expression of aspartate producing enzymes [28,99]. It is conceivable that the HIF1 $\alpha$ -dependent pathways that attenuate oxidative metabolism and that favor NADPH biosynthesis can together confer a cellular redox defense required for the initial stages of these tumors. It is possible that targeting those key amino acid carriers ensures the glutamine and cysteine supply for glutathione biosynthesis, which can help to counteract ccRCC growth. Conversely, HIF2 $\alpha$ -SLC7A5-mTORC1 might explain the oncogenic properties of HIF2 $\alpha$ . Allosteric inhibitors of mTORC1, everolimus and temsirolimus, counteract ccRCC progression in preclinical mouse models, and their clinical efficacy has been demonstrated in advanced renal cell carcinoma. Furthermore, pharmacological inhibitors of mTORC1 and of HIF2 $\alpha$ , can efficiently combat ccRCC growth. As detailed above SLC7A5 (and SLC1A5) are also elevated in ccRCC [80,92,93,100]. In this context it, would be interesting to consider whether targeting SLC7A5 (and SLC1A5), or interventions that alter the profile of circulating essential amino acids, can also benefit ccRCC management.

Finally, this review has largely focused on the role of HIF-dependent metabolism in cancer biology. However, it would also be interesting to explore its role in other scenarios in which HIFs plays a central role, such as cellular tolerance to ischemia-reperfusion, erythropoiesis or pathogen-induced inflammation. Moreover, amino acid carriers regulated by HIFs described in this review control the uptake of several

amino acids. For example, it is conceivable that the HIF2 $\alpha$ -SLC7A5 or HIF2 $\alpha$ -SLC1A5 pathways may also be involved in other amino acid-dependent pathways independent of mTORC1 activation, which may help better understand the pathophysiological impact of HIF through the reprogramming of amino acid metabolism.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF2016-76815), TV3 Marató (534/C/2016) and CIBERCV.

### Author contribution statement

JA wrote the manuscript and designed the general structure, sections and topics to be discussed in this mini-review. AB wrote specific parts of this review.

### References

- G.L. Semenza, Hypoxia-inducible Factors in Physiology and Medicine, *Cell*, (2012), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>.
- R.K. Bruick, S.L. McKnight, A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF, *Science* (80-. ). (2001). doi:<https://doi.org/10.1126/science.1066373>.
- A.C.R. Epstein, J.M. Gleadle, L.A. McNeill, K.S. Hewitson, J. O'Rourke, D.R. Mole, M. Mukherji, E. Metzzen, M.I. Wilson, A. Dhanda, Y.M. Tian, N. Masson, D.L. Hamilton, P. Jaakkola, R. Barstead, J. Hodgkin, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, C.J. Schofield, P.J. Ratcliffe, *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation, *Cell*. (2001). doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00507-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00507-4).
- M. Safran, W.G. Kaelin, HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway, *J. Clin. Invest.* (2003), <https://doi.org/10.1172/JCI200318181>.
- C.J. Schofield, P.J. Ratcliffe, Oxygen sensing by HIF hydroxylases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2004), <https://doi.org/10.1038/nrm1366>.
- B.H. Jiang, E. Rue, G.L. Wang, R. Roe, G.L. Semenza, Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1, *J. Biol. Chem.* (1996), <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17771>.
- P.J. Ratcliffe, J.F. O'Rourke, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression, *J. Exp. Biol.* 201 (8) (1998) 1153–1162.
- D. Lando, D.J. Peet, J.J. Gorman, D.A. Whelan, M.L. Whitelaw, R.K. Bruick, FIH-1 Is an Asparaginyl Hydroxylase Enzyme that Regulates the Transcriptional Activity of Hypoxia-Inducible Factor, *Genes Dev.* (2002), <https://doi.org/10.1101/gad.991402>.
- P.C. Mahon, K. Hirota, G.L. Semenza, FIH-1: A Novel Protein that Interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to Mediate Repression of HIF-1 Transcriptional Activity, *Genes Dev.* (2001), <https://doi.org/10.1101/gad.924501>.
- K.J.J. Briggs, P. Koivunen, S. Cao, K.M.M. Backus, B.A.A. Olenchock, H. Patel, Q. Zhang, S. Signoretti, G.J.J. Gerfen, A.L.L. Richardson, A.K.K. Witkiewicz, B.F.F. Cravatt, J. Clardy, W.G.G. Kaelin, Paracrine Induction of HIF by Glutamate in Breast Cancer: EglN1 Senses Cysteine, *Cell*, (2016), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.042>.
- N.S. Chandel, E. Maltepe, E. Goldwasser, C.E. Mathieu, M.C. Simon, P.T. Schumacker, Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998), <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11715>.
- H. Lu, C.L. Dalgard, A. Mohyeldin, T. McFate, A.S. Tait, A. Verma, Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1, *J. Biol. Chem.* (2005), <https://doi.org/10.1074/jbc.M508718200>.
- W.G. Kaelin, Cancer and altered metabolism: potential importance of hypoxia-inducible factor and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (2011), <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010975>.
- G.L. Semenza, A compendium of proteins that interact with HIF-1 $\alpha$ , *Exp. Cell Res.* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.041>.
- G.L. Semenza, HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations, *J. Clin. Invest.* (2013), <https://doi.org/10.1172/JCI67230>.
- J.W. Kim, I. Tchernyshyov, G.L. Semenza, C.V. Dang, HIF-1-Mediated Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase: A Metabolic Switch Required for Cellular Adaptation to Hypoxia, *Cell Metab.* (2006), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>.
- I. Papandreou, R.A. Cairns, L. Fontana, A.L. Lim, N.C. Denko, HIF-1 Mediates Adaptation to Hypoxia by Actively Downregulating Mitochondrial Oxygen Consumption, *Cell Metab.* (2006), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.012>.
- J. Aragonés, M. Schneider, K. Van Geyte, P. Fraisl, T. Dresselaers, M. Mazzone, R. Dirx, S. Zaccagna, H. Lemieux, N.H. Jeoung, D. Lambrechts, T. Bishop, P. Lafuste, A. Diez-Juan, S.K. Harten, P. Van Noten, K. De Bock, C. Willam, M. Tjwa, A. Grosfeld, R. Navet, L. Moons, T. Vandendriessche, C. Deroose, B. Wijeyekoon, J. Nuyts, B. Jordan, R. Silasi-Mansat, F. Lupu, M. Dewerchin, C. Pugh, P. Salmon, L. Mortelmans, B. Gallez, F. Gorus, J. Buyse, F. Sluse, R.A. Harris, E. Gnaiger, P. Hespel, P. Van Hecke, F. Schuit, P. Van Veldhoven, P. Ratcliffe, M. Baes, P. Maxwell, P. Carmeliet, Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism, *Nat. Genet.* (2008). doi:<https://doi.org/10.1038/ng.2007.62>.
- C.W. Lu, S.C. Lin, K.F. Chen, Y.Y. Lai, S.J. Tsai, Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance, *J. Biol. Chem.* (2008), <https://doi.org/10.1074/jbc.M803508200>.
- B. Li, Y. Cao, G. Meng, L. Qian, T. Xu, C. Yan, O. Luo, S. Wang, J. Wei, Y. Ding, D. Yu, Targeting Glutaminase 1 Attenuates Stemness Properties in Hepatocellular Carcinoma by Increasing Reactive Oxygen Species and Suppressing Wnt/Beta-Catenin Pathway, *EBioMedicine*, (2019), <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.063>.
- B.J. Altman, Z.E. Stine, C.V. Dang, From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* (2016), <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.71>.
- K. Birsoy, T. Wang, W.W. Chen, E. Freinkman, M. Abu-Remaileh, D.M. Sabatini, An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis, *Cell*, (2015), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.016>.
- J.M. Buescher, M.R. Antoniewicz, L.G. Boros, S.C. Burgess, H. Brunengraber, C.B. Clish, R.J. DeBerardinis, O. Feron, C. Frezza, B. Ghesquiere, E. Gottlieb, K. Hiller, R. G. Jones, J.J. Kamphorst, R.G. Kibbey, A.C. Kimmelman, J.W. Locasale, S.Y. Lunt, O.D.K. Maddocks, C. Malloy, C.M. Metallo, E.J. Meuillet, J. Munger, K. Nöh, J.D. Rabinowitz, M. Ralser, U. Sauer, G. Stephanopoulos, J. St-Pierre, D.A. Tennant, C. Wittmann, M.G. Vander Heiden, A. Vazquez, K. Voudsen, J.D. Young, N. Zamboni, S.M. Fendt, A roadmap for interpreting 13C metabolite labeling patterns from cells, *Curr. Opin. Biotechnol.* (2015). doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.003>.
- L.B. Sullivan, D.Y. Gui, A.M. Hosios, L.N. Bush, E. Freinkman, M.G. Vander Heiden, Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells, *Cell*, (2015), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.017>.
- S. Stegen, N. Van Gestel, G. Eelen, B. Ghesquière, F. D'Anna, B. Thienpont, J. Goveia, S. Torrekens, R. Van Looveren, F.P. Luyten, P.H. Maxwell, B. Wieloockx, D. Lambrechts, S.M. Fendt, P. Carmeliet, G. Carmeliet, HIF-1 $\alpha$  Promotes Glutamine-Mediated Redox Homeostasis and Glycogen-Dependent Bioenergetics to Support Postimplantation Bone Cell Survival, *Cell Metab.* (2016), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.002>.
- Y. Shang, Y.L. Siow, C.K. Isaak, O. Karmin, Downregulation of Glutathione Biosynthesis Contributes to Oxidative Stress and Liver Dysfunction in Acute Kidney Injury, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, <https://doi.org/10.1155/2016/9707292>.
- P.A. Tyraakis, A. Palazon, D. Macias, K.L. Lee, A.T. Phan, P. Velica, J. You, G.S. Chia, J. Sim, A. Doedens, A. Abelanet, C.E. Evans, J.R. Griffiths, L. Poellinger, A.W. Goldrath, R.S. Johnson, S-2-Hydroxyglutarate Regulates CD8 + T-Lymphocyte Fate, *Nature*, (2016), <https://doi.org/10.1038/nature20165>.
- F. Meléndez-Rodríguez, A.A. Urrutia, D. Lorendeau, G. Rinaldi, O. Roche, N. Böğürçü-Seidel, M. Ortega Muelas, C. Mesa-Ciller, G. Turiel, A. Bouthelie, P. Hernansanz-Agustín, A. Elorza, E. Escasany, Q.O.Y. Li, M. Torres-Capelli, D. Tello, E. Fuentes, E. Fraga, A. Martínez-Ruiz, B. Pérez, J.M. Giménez-Bachs, A.S. Salinas-Sánchez, T. Acker, R. Sánchez Prieto, S.M. Fendt, K. De Bock, J. Aragonés, HIF1 $\alpha$  Suppresses Tumor Cell Proliferation through Inhibition of Aspartate Biosynthesis, *Cell Rep.* (2019). doi:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.106>.
- Y. Wang, C. Bai, Y. Ruan, M. Liu, Q. Chu, L. Qiu, C. Yang, B. Li, Coordinative metabolism of glutamine carbon and nitrogen in proliferating cancer cells under hypoxia, *Nat. Commun.* (2019), <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08033-9>.
- W.D. Lee, D. Mukha, E. Aizenshtein, T. Shlomi, Spatial-fluxomics provides a sub-cellular-compartmentalized view of reductive glutamine metabolism in cancer cells, *Nat. Commun.* (2019), <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09352-1>.
- M. Morotti, E. Bridges, A. Valli, H. Choudhry, H. Sheldon, S. Wigfield, N. Gray, C.E. Zois, F. Grimm, D. Jones, E.J. Teoh, W.C. Cheng, S. Lord, D. Anastasiou, S. Haider, A. McIntyre, D.C.I. Goberdhan, F. Buffa, A.L. Harris, Hypoxia-induced switch in SNAT2/SLC38A2 regulation generates endocrine resistance in breast cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2019), <https://doi.org/10.1073/pnas.1818521116>.
- C. Corbet, N. Draoui, F. Polet, A. Pinto, X. Drozak, O. Riant, O. Feron, The SIRT1/HIF2 $\alpha$  Axis Drives Reductive Glutamine Metabolism under Chronic Acidosis and Alters Tumor Response to Therapy, *Cancer Res.* (2014), <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0705>.
- H.C. Yoo, S.J. Park, M. Nam, J. Kang, K. Kim, J.H. Yeo, J.-K. Kim, Y. Heo, H.S. Lee, M.Y. Lee, C.W. Lee, J.S. Kang, Y.-H. Kim, J. Lee, J. Choi, G.-S. Hwang, S. Bang, J.M. Han, A Variant of SLC1A5 Is a Mitochondrial Glutamine Transporter for Metabolic Reprogramming in Cancer Cells, *Cell Metab.* (2019) 1–17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.020>.
- L. Xiang, J. Mou, B. Shao, Y. Wei, H. Liang, N. Takano, G.L. Semenza, G. Xie, Glutaminase 1 Expression in Colorectal Cancer Cells Is Induced by Hypoxia and Required for Tumor Growth, Invasion, and Metastatic Colonization, *Cell Death Dis.* (2019), <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1291-5>.
- G. Wu, Y.-Z. Fang, S. Yang, J.R. Lupton, N.D. Turner, Glutathione metabolism and its implications for health, *J. Nutr.* (2004), <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>.
- H. Lu, D. Samanta, L. Xiang, H. Zhang, H. Hu, I. Chen, J.W. Bullen, G.L. Semenza, Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper chelation

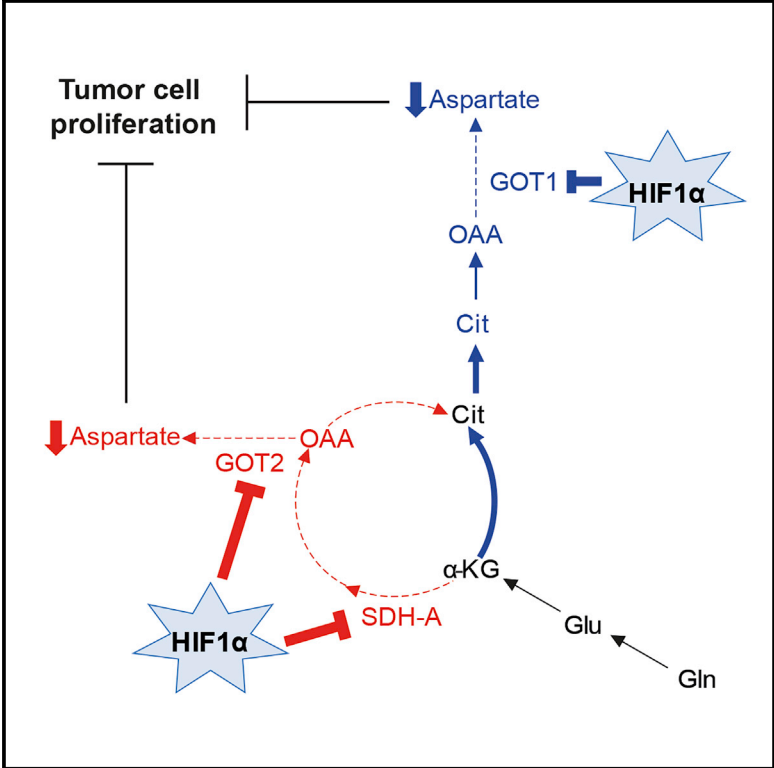
- that induces the breast cancer stem cell phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2015), <https://doi.org/10.1073/pnas.151343112>.
- [37] A. Leitherer, K. Geiger, A. Muendlein, H. Drexel, Hypoxia induces a HIF-1 $\alpha$  dependent signaling cascade to make a complex metabolic switch in SGBS-adipocytes, *Mol. Cell. Endocrinol.* (2014), <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.11.009>.
- [38] T.A. Ogunrinu, H. Sontheimer, Hypoxia increases the dependence of glioma cells on glutathione, *J. Biol. Chem.* (2010), <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.161190>.
- [39] H. Hu, N. Takano, L. Xiang, D.M. Gilkes, W. Luo, G.L. Semenza, Hypoxia-Inducible Factors Enhance Glutamate Signaling in Cancer Cells, *Oncotarget*, (2014), <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2593>.
- [40] E. Favaro, K. Bensaad, M.G. Chong, D.A. Tennant, D.J.P. Ferguson, C. Snell, G. Steers, H. Turley, J.L. Li, U.L. Günther, F.M. Buffa, A. McIntyre, A.L. Harris, Glucose Utilization Via Glycogen Phosphorylase Sustains Proliferation and Prevents Premature Senescence in Cancer Cells, *Cell Metab.* (2012), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.017>.
- [41] N. Pascador, D. Villar, D. Cifuentes, M. Garcia-Rocha, A. Ortiz-Barahona, S. Vazquez, A. Ordoñez, Y. Cuevas, D. Saez-Morales, M.L. Garcia-Bermejo, M.O. Landazuri, J. Guinovart, L. Del Peso, Hypoxia Promotes Glycogen Accumulation through Hypoxia Inducible Factor (HIF)-Mediated Induction of Glycogen Synthase 1, *PLoS One*, (2010), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009644>.
- [42] J. Pelletier, G. Bellot, P. Gounon, S. Lacas-Gervais, J. Pouyssegur, N.M. Mazure, Glycogen Synthesis Is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival, *Front. Oncol.* (2012), <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00018>.
- [43] D. Samanta, Y. Park, S.A. Andrabi, L.M. Shelton, D.M. Gilkes, G.L. Semenza, PHGDH Expression Is Required for Mitochondrial Redox Homeostasis, Breast Cancer Stem Cell Maintenance, and Lung Metastasis, *Cancer Res.* (2016), <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0530>.
- [44] J.L. Coloff, J.P. Murphy, C.R. Braun, I.S. Harris, L.M. Shelton, K. Kami, S.P. Gygi, L.M. Selfors, J.S. Brugge, Differential Glutamate Metabolism in Proliferating and Quiescent Mammary Epithelial Cells, *Cell Metab.* (2016), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.03.016>.
- [45] R.C. Sun, N.C. Denko, Hypoxic Regulation of Glutamine Metabolism through HIF1 and SIAH2 Supports Lipid Synthesis that Is Necessary for Tumor Growth, *Cell Metab.* (2014), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.022>.
- [46] P.L.M. Dahia, K.N. Ross, M.E. Wright, C.Y. Hayashida, S. Santagata, M. Barontini, A.L. Kung, G. Sanso, J.F. Powers, A.S. Tischler, R. Hodin, S. Heitritter, F. Moore, R. Dluhy, J.A. Sosa, I.T. Ocal, D.E. Benn, D.J. Marsh, B.G. Robinson, K. Schneider, J. Garber, S.M. Arum, M. Korbonits, A. Grossman, P. Pigny, S.P.A. Toledo, V. Nose, C. Li, C.D. Stiles, A Hif1 $\alpha$  Regulatory Loop Links Hypoxia and Mitochondrial Signals in Pheochromocytomas, *PLoS Genet.* (2005), <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010008>.
- [47] L. Hulea, S.P. Gravel, M. Morita, M. Cargnello, O. Uchenunu, Y.K. Im, C. Lehuédé, E. H. Ma, M. Leibovitch, S. McLaughlan, M.J. Blouin, M. Parisotto, V. Papavasiliou, C. Lavoie, O. Larsson, M. Ohh, T. Ferreira, C. Greenwood, G. Bridon, D. Avizonis, G. Ferbyre, P. Siegel, R.G. Jones, W. Muller, J. Ursini-Siegel, J. St-Pierre, M. Pollak, I. Topisirovic, Translational and HIF-1 $\alpha$ -Dependent Metabolic Reprogramming Underpin Metabolic Plasticity and Responses to Kinase Inhibitors and Biguanides, *Cell Metab.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.001>.
- [48] C.M. Metallo, P.A. Gameiro, E.L. Bell, K.R. Mattaini, J. Yang, K. Hiller, C.M. Jewell, Z.R. Johnson, D.J. Irvine, L. Guarente, J.K. Kelleher, M.G. Vander Heiden, O. Iliopoulos, G. Stephanopoulos, Reductive Glutamine Metabolism by IDH1 Mediates Lipogenesis under Hypoxia, *Nature*, (2012), <https://doi.org/10.1038/nature10602>.
- [49] A.R. Mullen, W.W. Wheaton, E.S. Jin, P.H. Chen, L.B. Sullivan, T. Cheng, Y. Yang, W.M. Linehan, N.S. Chandel, R.J. DeBerardinis, Reductive Carboxylation Supports Growth in Tumour Cells with Defective Mitochondria, *Nature*, (2012), <https://doi.org/10.1038/nature10642>.
- [50] D.R. Wise, P.S. Ward, J.E.S. Shay, J.R. Cross, J.J. Gruber, U.M. Sachdeva, J.M. Platt, R.G. DeMatteo, M.C. Simon, C.B. Thompson, Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2011), <https://doi.org/10.1073/pnas.111773108>.
- [51] P.A. Gameiro, J. Yang, A.M. Metelo, R. Pérez-Carro, R. Baker, Z. Wang, A. Arreola, W.K. Rathmell, A. Olumi, P. López-Larrubia, G. Stephanopoulos, O. Iliopoulos, In Vivo HIF-Mediated Reductive Carboxylation Is Regulated by Citrate Levels and Sensitizes VHL-Deficient Cells to Glutamine Deprivation, *Cell Metab.* (2013), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.002>.
- [52] A. Okazaki, P.A. Gameiro, D. Christodoulou, L. Laviollette, M. Schneider, F. Chaves, A. Stemmer-Rachamimov, S.A. Yazinski, R. Lee, G. Stephanopoulos, L. Zou, O. Iliopoulos, Glutaminase and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors suppress pyrimidine synthesis and VHL-deficient renal cancers, *J. Clin. Invest.* (2017), <https://doi.org/10.1172/JCI87800>.
- [53] D. Lorendau, G. Rinaldi, R. Boon, P. Spincemaille, K. Metzger, C. Jäger, S. Christen, X. Dong, S. Kuenen, K. Voordeckers, P. Verstreken, D. Cassiman, P. Vermeersch, C. Verraille, K. Hiller, S.M. Fendt, Dual loss of succinate dehydrogenase (SDH) and complex I activity is necessary to recapitulate the metabolic phenotype of SDH mutant tumors, *Metab. Eng.* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.11.005>.
- [54] S.M. Fendt, E.L. Bell, M.A. Keibler, B.A. Olenchock, J.R. Mayers, T.M. Wasylenko, N.I. Vokes, L. Guarente, M.G.V. Heiden, G. Stephanopoulos, Reductive glutamine metabolism is a function of the  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate ratio in cells, *Nat. Commun.* (2013), <https://doi.org/10.1038/ncomms3236>.
- [55] J. Fan, J.J. Kamphorst, J.D. Rabinowitz, T. Shlomi, Fatty acid labeling from glutamine in hypoxia can be explained by isotope exchange without net reductive isocitrate dehydrogenase (IDH) flux, *J. Biol. Chem.* (2013), <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.502740>.
- [56] K.H. Tsui, L.C. Chung, S.W. Wang, T.H. Feng, P.L. Chang, H.H. Juang, Hypoxia upregulates the gene expression of mitochondrial acinase in prostate carcinoma cells, *J. Mol. Endocrinol.* (2013), <https://doi.org/10.1530/JME-13-0090>.
- [57] D.C. Liu, X. Zheng, Y. Zho, W.R. Yi, Z.H. Li, X. Hu, A.X. Yu, HIF-1-inhibits IDH-1 expression in osteosarcoma, *Oncol. Rep.* (2017), <https://doi.org/10.3892/or.2017.5655>.
- [58] P. Carmeliet, Y. Dor, J.M. Herber, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C.J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R.K. Jain, D. Collen, E. Keshet, Role of HIF-1 $\alpha$  in Hypoxia-mediated Apoptosis, Cell Proliferation and Tumour Angiogenesis, *Nature*, (1998), <https://doi.org/10.1038/28867>.
- [59] J.D. Gordan, J.A. Bertout, C.J. Hu, J.A. Diehl, M.C. Simon, HIF-2 $\alpha$  Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing c-Myc Transcriptional Activity, *Cancer Cell*, (2007), <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.02.006>.
- [60] M.E. Hubbi, Kshitiz, D.M. Gilkes, S. Rey, C.C. Wong, W. Luo, D.H. Kim, C. V. Dang, A. Levchenko, G.L. Semenza, A nontranscriptional role for HIF-1 $\alpha$  as a direct inhibitor of DNA replication, *Sci. Signal.* (2013), <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003417>.
- [61] C. Shen, R. Beroukham, S.E. Schumacher, J. Zhou, M. Chang, S. Signoretti, W.G. Kaelin, Genetic and Functional Studies Implicate HIF1 $\alpha$  as a 14q Kidney Cancer Suppressor Gene, *Cancer Discov.* (2011), <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0098>.
- [62] M. Koshiji, Y. Kageyama, E.A. Pete, I. Horikawa, J.C. Barrett, L.E. Huang, HIF-1 $\alpha$  Induces Cell Cycle Arrest by Functionally Counteracting Myc, *EMBO J.* (2004), <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600196>.
- [63] A.N. Lane, T.W.M. Fan, Regulation of Mammalian Nucleotide Metabolism and Biosynthesis, *Nucleic Acids Res.* (2015), <https://doi.org/10.1093/nar/gkv047>.
- [64] A.A. Hakimi, E. Reznik, C.H. Lee, C.J. Creighton, A.R. Brannon, A. Luna, B.A. Aksoy, E.M. Liu, R. Shen, W. Lee, Y. Chen, S.M. Stürdivant, P. Russo, Y.B. Chen, S.K. Tickoo, V.E. Reuter, E.H. Cheng, C. Sander, J.J. Hsieh, An Integrated Metabolic Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma, *Cancer Cell*, (2016), <https://doi.org/10.1016/j.cccell.2015.12.004>.
- [65] J. Garcia-Bermudez, L. Baudrier, K. La, X.G. Zhu, J. Fidelin, V.O. Sviderskiy, T. Papagiannakopoulos, H. Molina, M. Snuderl, C.A. Lewis, R.L. Possemato, K. Birsoy, Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours, *Nat. Cell Biol.* (2018), <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0118-z>.
- [66] L.B. Sullivan, A. Luengo, L.V. Danai, L.N. Bush, F.F. Diehl, A.M. Hosios, A.N. Lau, S. Elmiligy, S. Malstrom, C.A. Lewis, M.G. Vander Heiden, Aspartate is an endogenous metabolic limitation for tumour growth, *Nat. Cell Biol.* (2018), <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0125-0>.
- [67] J.J. Lum, T. Bui, M. Gruber, J.D. Gordan, R.J. DeBerardinis, K.L. Covello, M.C. Simon, C.B. Thompson, The Transcription Factor HIF-1 Plays a Critical Role in the Growth Factor-Dependent Regulation of both Aerobic and Anaerobic Glycolysis, *Genes Dev.* (2007), <https://doi.org/10.1101/gad.1529107>.
- [68] S. Stegen, K. Laperre, G. Eelen, G. Rinaldi, P. Fraisl, S. Torrekens, R. Van Looveren, S. Loopmans, G. Bultynck, S. Vinckier, F. Meersman, P.H. Maxwell, J. Rai, M.A. Weis, D.R. Eyre, B. Ghesquière, S.M. Fendt, P. Carmeliet, G. Carmeliet, HIF-1 $\alpha$  Metabolically Controls Collagen Synthesis and Modification in Chondrocytes, *Nature*, (2019), <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0874-3>.
- [69] K.H. Hofbauer, B. Gess, C. Lohaus, H.E. Meyer, D. Katschinski, A. Kurtz, Oxygen tension regulates the expression of a group of procollagen hydroxylases, *Eur. J. Biochem.* (2003), <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03846.x>.
- [70] D.F. Higgins, K. Kimura, W.M. Bernhardt, N. Shrimanker, Y. Akai, B. Hohenstein, Y. Saito, R.S. Johnson, M. Kretzler, C.D. Cohen, K.U. Eckardt, M. Iwano, V.H. Haase, Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition, *J. Clin. Invest.* (2007), <https://doi.org/10.1172/JCI30487>.
- [71] J. Myllyharju, Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets, *Ann. Med.* (2008), <https://doi.org/10.1080/07853890801986594>.
- [72] J. Myllyharju, K.I. Kivirikko, Collagens, Modifying Enzymes and their Mutations in Humans, Flies and Worms, *Trends Genet.* (2004), <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.11.004>.
- [73] R.A. Saxton, D.M. Sabatini, mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease, *Cell*, (2017), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>.
- [74] J. Brugarolas, K. Lei, R.L. Hurler, B.D. Manning, J.H. Reiling, E. Hafen, L.A. Witters, L.W. Ellisen, W.G. Kaelin, Regulation of mTOR Function in Response to Hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 Tumor Suppressor Complex, *Genes Dev.* (2004), <https://doi.org/10.1101/gad.1256804>.
- [75] X.M. Ma, J. Blenis, Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2009), <https://doi.org/10.1038/nrm2672>.
- [76] B.D. Manning, L.C. Cantley, Rheb fills a GAP between TSC and TOR, *Trends Biochem. Sci.* (2003), <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.09.003>.
- [77] M.P. Deyoung, P. Horak, A. Sofer, D. Sgroi, L.W. Ellisen, Hypoxia Regulates TSC1/2-mTOR Signaling and Tumor Suppression through REDD1-Mediated 14-3-3 Shuttling, *Genes Dev.* (2008), <https://doi.org/10.1101/gad.1617608>.
- [78] Y. Li, Y. Wang, E. Kim, P. Beemiller, C.Y. Wang, J. Swanson, M. You, K.L. Guan, Bnip 3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb, *J. Biol. Chem.* (2007), <https://doi.org/10.1074/jbc.M705231200>.
- [79] L. Liu, T.P. Cash, R.G. Jones, B. Keith, C.B. Thompson, M.C. Simon, Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth, *Mol. Cell* (2006), <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.010>.
- [80] A. Elorza, I. Soro-Arnáiz, F. Meléndez-Rodríguez, V. Rodríguez-Vaello,



- G. Marsboom, G. de Cárcer, B. Acosta-Iborra, L. Albacete-Albacete, A. Ordóñez, L. Serrano-Oviedo, J.M. Giménez-Bachs, A. Vara-Vega, A. Salinas, R. Sánchez-Prieto, R. Martín del Río, F. Sánchez-Madrid, M. Malumbres, M.O. Landázuri, J. Aragonés, HIF2 $\alpha$  acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5, *Mol. Cell* (2012), <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.017>.
- [81] H. Doan, A. Parsons, S. Devkumar, J. Selvarajah, F. Miralles, V.A. Carroll, HIF-Mediated Suppression of DEPTOR Confers Resistance to mTOR Kinase Inhibition in Renal Cancer, *iScience*, (2019), <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.10.047>.
- [82] D. Macias, A.S. Cowburn, H. Torres-Torrel, P. Ortega-Sáenz, J. López-Barneo, R.S. Johnson, HIF-2 $\alpha$  Is Essential for Carotid Body Development and Function, *Elife*, (2018), <https://doi.org/10.7554/eLife.34681>.
- [83] Y. Onishi, M. Hiraiwa, H. Kamada, T. Iezaki, T. Yamada, K. Kaneda, E. Hinoi, Hypoxia Affects Slc7a5 Expression through HIF-2 $\alpha$  in Differentiated Neuronal Cells, *FEBS Open Bio*, (2019), <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12559>.
- [84] V.P. Krymskaya, J. Snow, G. Cesarone, I. Khavin, D.A. Goncharov, P.N. Lim, S.C. Veasey, K. Ihida-Stansbury, P.L. Jones, E.A. Goncharova, mTOR Is Required for Pulmonary Arterial Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation under Chronic Hypoxia, *FASEB J*, (2011), <https://doi.org/10.1096/fj.10-175018>.
- [85] K. Kondo, W.Y. Kim, M. Lechpammer, W.G. Kaelin, Inhibition of HIF2 $\alpha$  Is Sufficient to Suppress pVHL-Defective Tumor Growth, *PLoS Biol.* (2003), <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000083>.
- [86] M. Torres-Capelli, G. Marsboom, Q.O.Y. Li, D. Tello, F.M. Rodriguez, T. Alonso, F. Sanchez-Madrid, F. Garcia-Rio, J. Ancochea, J. Aragonés, Role of Hif2 $\alpha$  oxygen sensing pathway in bronchial epithelial Club cell proliferation, *Sci. Rep.* (2016), <https://doi.org/10.1038/srep25357>.
- [87] R.R. Raval, K.W. Lau, M.G.B. Tran, H.M. Sowter, S.J. Mandriota, J.-L. Li, C.W. Pugh, P.H. Maxwell, A.L. Harris, P.J. Ratcliffe, Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma, *Mol. Cell. Biol.* (2005), <https://doi.org/10.1128/mcb.25.13.5675-5686.2005>.
- [88] R.A. Saxton, K.E. Knockenhauer, R.L. Wolfson, L. Chantranupong, M.E. Pacold, T. Wang, T.U. Schwartz, D.M. Sabatini, Structural basis for leucine sensing by the Sestrin 2-mTORC1 pathway, *Science* (80-. ). (2016). doi:<https://doi.org/10.1126/science.aad2087>.
- [89] Y. Cormerais, S. Giuliano, R. LeFloch, B. Front, J. Durivault, E. Tambutté, P.A. Massard, L.R. De La Ballina, H. Endou, M.F. Wempe, M. Palacin, S.K. Parks, J. Pouyssegur, Genetic Disruption of the Multifunctional CD98/LAT1 Complex Demonstrates the Key Role of Essential Amino Acid Transport in the Control of mTORC1 and Tumor Growth, *Cancer Res*, (2016), <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3376>.
- [90] M. Yue, J. Jiang, P. Gao, H. Liu, G. Qing, Oncogenic MYC Activates a Feedforward Regulatory Loop Promoting Essential Amino Acid Metabolism and Tumorigenesis, *Cell Rep*, (2017), <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.002>.
- [91] M.A. Reid, W.I. Wang, K.R. Rosales, M.X. Welliver, M. Pan, M. Kong, The B55 $\alpha$  subunit of PP2A drives a p53-dependent metabolic adaptation to glutamine deprivation, *Mol. Cell* (2013), <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.008>.
- [92] H. Betsunoh, T. Fukuda, N. Anzai, D. Nishihara, T. Mizuno, H. Yuki, A. Masuda, Y. Yamaguchi, H. Abe, M. Yashi, Y. Fukabori, K.I. Yoshida, T. Kamai, Increased Expression of System Large Amino Acid Transporter (LAT)-1 mRNA Is Associated with Invasive Potential and Unfavorable Prognosis of Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma, *BMC Cancer*, (2013), <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-509>.
- [93] K. Higuchi, S. Sakamoto, K. Ando, M. Maimaiti, N. Takeshita, K. Okunushi, Y. Reien, Y. Imamura, T. Sazuka, K. Nakamura, J. Matsushima, T. Furihata, Y. Ikehara, T. Ichikawa, N. Anzai, Characterization of the expression of LAT1 as a prognostic indicator and a therapeutic target in renal cell carcinoma, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53397-7>.
- [94] B. Zhang, Y. Chen, X. Shi, M. Zhou, L. Bao, K.J. Hatanpaa, T. Patel, R.J. DeBerardinis, Y. Wang, W. Luo, Regulation of branched-chain amino acid metabolism by hypoxia-inducible factor in glioblastoma, *Cell. Mol. Life Sci.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03483-1>.
- [95] B. Kucejova, S. Peña-Llopis, T. Yamasaki, S. Sivanand, T.A.T. Tran, S. Alexander, N.C. Wolff, Y. Lotan, X.J. Xie, W. Kabbani, P. Kapur, J. Brugarolas, Interplay between pVHL and mTORC1 pathways in clear-cell renal cell carcinoma, *Mol. Cancer Res.* (2011), <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0302>.
- [96] R.V. Durán, W. Oppliger, A.M. Robitaille, L. Heiserich, R. Skendaj, E. Gottlieb, M.N. Hall, Glutaminolysis activates rag-mTORC1 signaling, *Mol. Cell* (2012), <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.043>.
- [97] P. Nicklin, P. Bergman, B. Zhang, E. Triantafellow, H. Wang, B. Nyfeler, H. Yang, M. Hild, C. Kung, C. Wilson, V.E. Myer, J.P. MacKeigan, J.A. Porter, Y.K. Wang, L.C. Cantley, P.M. Finan, L.O. Murphy, Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy, *Cell*, (2009), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.044>.
- [98] K.D. Courtney, D. Bezwada, T. Mashimo, K. Pichumani, V. Vemireddy, A.M. Funk, J. Wimberly, S.S. McNeil, P. Kapur, Y. Lotan, V. Margulis, J.A. Cadeddu, I. Pedrosa, R.J. DeBerardinis, C.R. Malloy, R.M. Bachoo, E.A. Maher, Isotope Tracing of Human Clear Cell Renal Cell Carcinomas Demonstrates Suppressed Glucose Oxidation in Vivo, *Cell Metab*, (2018), <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.020>.
- [99] N. Pandey, V. Lanke, P.K. Vinod, Network-based metabolic characterization of renal cell carcinoma, *Sci. Rep.* 10 (2020) 5955, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62853-8>.
- [100] Y. Liu, L. Yang, H. An, Y. Chang, W. Zhang, Y. Zhu, L. Xu, J. Xu, High expression of solute carrier family 1, member 5 (SLC1A5) is associated with poor prognosis in clear-cell renal cell carcinoma, *Sci. Rep.* (2015), <https://doi.org/10.1038/srep16954>.

## HIF1 $\alpha$ Suppresses Tumor Cell Proliferation through Inhibition of Aspartate Biosynthesis

### Graphical Abstract



### Authors

Florinda Meléndez-Rodríguez, Andrés A. Urrutia, Doriane Lorendeau, ..., Sarah-Maria Fendt, Katrien De Bock, Julián Aragonés

### Correspondence

jaragones.hlpr@salud.madrid.org

### In Brief

Meléndez-Rodríguez et al. show that HIF1 $\alpha$  impairs oxidative and reductive aspartate biogenesis, which consequently drives HIF1 $\alpha$ -dependent suppression of tumor cell proliferation. Mechanistically, HIF1 $\alpha$  represses the aspartate-producing enzymes GOT1 and GOT2 in several biological settings, including human VHL-deficient renal cell carcinoma, in which HIF1 $\alpha$  can act as a tumor suppressor.

### Highlights

- HIF1 $\alpha$  reduces intracellular aspartate levels
- HIF1 $\alpha$  impairs oxidative and reductive aspartate biosynthesis
- The aspartate-generating GOT1 and GOT2 enzymes are repressed by HIF1 $\alpha$
- Aspartate supplementation counteracts the antiproliferative influence of HIF1 $\alpha$



# HIF1 $\alpha$ Suppresses Tumor Cell Proliferation through Inhibition of Aspartate Biosynthesis

Florinda Meléndez-Rodríguez,<sup>1,2,14</sup> Andrés A. Urrutia,<sup>1,14</sup> Doriane Lorendeau,<sup>4,5</sup> Gianmarco Rinaldi,<sup>4,5</sup> Olga Roche,<sup>7,8</sup> Nuray Bögürçü-Seidel,<sup>9</sup> Marta Ortega Muelas,<sup>8</sup> Claudia Mesa-Celler,<sup>1</sup> Guillermo Turiel,<sup>1</sup> Antonio Bouthelier,<sup>1</sup> Pablo Hermansanz-Agustín,<sup>1</sup> Ainara Elorza,<sup>1</sup> Elia Escasany,<sup>1</sup> Qilong Oscar Yang Li,<sup>1</sup> Mar Torres-Capelli,<sup>1</sup> Daniel Tello,<sup>1</sup> Esther Fuertes,<sup>1</sup> Enrique Fraga,<sup>1</sup> Antonio Martínez-Ruiz,<sup>1,2</sup> Belen Pérez,<sup>11,12</sup> Jose Miguel Giménez-Bachs,<sup>10</sup> Antonio S. Salinas-Sánchez,<sup>10</sup> Till Acker,<sup>9</sup> Ricardo Sánchez Prieto,<sup>6,7</sup> Sarah-Maria Fendt,<sup>4,5</sup> Katrien De Bock,<sup>3</sup> and Julián Aragonés<sup>1,2,13,\*</sup>

<sup>1</sup>Research Unit, Hospital of Santa Cristina, Research Institute Princesa (IP), Autonomous University of Madrid, Madrid 28009, Spain

<sup>2</sup>CIBER de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Carlos III Health Institute, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Department of Health Sciences and Technology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zurich, Switzerland

<sup>4</sup>Laboratory of Cellular Metabolism and Metabolic Regulation, VIB Center for Cancer Biology, VIB, Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium

<sup>5</sup>Laboratory of Cellular Metabolism and Metabolic Regulation, Department of Oncology, KU Leuven and Leuven Cancer Institute (LKI), Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium

<sup>6</sup>Departamento de Biología del Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), Unidad Asociada de Biomedicina UCLM, Unidad Asociada al CSIC, Madrid, Spain

<sup>7</sup>Departamento de Ciencias Médicas, Facultad de Medicina de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain

<sup>8</sup>Laboratorio de Oncología, Unidad de Medicina Molecular, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas/UCLM, Unidad Asociada de Biomedicina UCLM-CSIC, 02006 Albacete, Spain

<sup>9</sup>Institute of Neuropathology, University of Giessen, Giessen, Germany

<sup>10</sup>Servicio de Urología, Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Facultad de Medicina de la UCLM, Albacete, Spain

<sup>11</sup>Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, Centro de Biología Molecular-SO UAM-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

<sup>12</sup>CIBERER, Madrid, IdiPaz, Spain

<sup>13</sup>Lead Contact

<sup>14</sup>These authors contributed equally

\*Correspondence: [jaragones.hlpr@salud.madrid.org](mailto:jaragones.hlpr@salud.madrid.org)

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.106>

## SUMMARY

Cellular aspartate drives cancer cell proliferation, but signaling pathways that rewire aspartate biosynthesis to control cell growth remain largely unknown. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) can suppress tumor cell proliferation. Here, we discovered that HIF1 $\alpha$  acts as a direct repressor of aspartate biosynthesis involving the suppression of several key aspartate-producing proteins, including cytosolic glutamic-oxaloacetic transaminase-1 (GOT1) and mitochondrial GOT2. Accordingly, HIF1 $\alpha$  suppresses aspartate production from both glutamine oxidation as well as the glutamine reductive pathway. Strikingly, the addition of aspartate to the culture medium is sufficient to relieve HIF1 $\alpha$ -dependent repression of tumor cell proliferation. Furthermore, these key aspartate-producing players are specifically repressed in VHL-deficient human renal carcinomas, a paradigmatic tumor type in which HIF1 $\alpha$  acts as a tumor suppressor, highlighting the *in vivo* relevance of these findings. In conclusion, we show that HIF1 $\alpha$  inhibits cytosolic and mitochondrial aspartate biosynthesis and that this mechanism is the molecular basis for HIF1 $\alpha$  tumor suppressor activity.

## INTRODUCTION

The biosynthesis of aspartate is central in cancer cell autonomous proliferation because it is essential not only for protein synthesis but also for nucleotide biosynthesis in proliferating cells (Birsoy et al., 2015; Lane and Fan, 2015; Sullivan et al., 2015). Circulating levels of aspartate are low compared with other amino acids (Mayers and Vander Heiden, 2015), and it is presumed that most cells largely rely on intracellular aspartate biosynthesis to sustain cellular growth. Aspartate biosynthesis is driven largely by glucose- or glutamine-dependent refilling of the tricarboxylic acid (TCA) cycle to replenish mitochondrial TCA intermediate oxaloacetate, which is subsequently converted to aspartate through the activity of mitochondrial glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT2). Alternatively, cells can also use reductive glutamine metabolism to generate aspartate through the cytosolic GOT1 isoform (Birsoy et al., 2015). This function of GOT1 is relevant to sustain aspartate biosynthesis and cell proliferation when mitochondrial-dependent aspartate biosynthesis is compromised (Birsoy et al., 2015). However, the intracellular signals that rewire aspartate biosynthesis to attenuate cell growth remain largely unknown.

Hypoxia-inducible factors (HIFs) are key transcriptional regulators of the adaptive tumor cellular response to low oxygen tension. Under normoxic conditions, critical key proline residues in HIF $\alpha$  subunits are hydroxylated by prolyl hydroxylases (PHD1–3), which ultimately leads to their recognition by the von Hippel-Lindau (VHL) protein and their consequent degradation by the



proteasome (Epstein et al., 2001; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Wang et al., 1995). In hypoxic conditions, PHD activity is restrained, and therefore VHL is unable to recognize HIF $\alpha$  subunits, leading to their nuclear accumulation. HIF $\alpha$  can act as a repressor of tumor cell proliferation in different biological settings (Carmeliet et al., 1998; Gordan et al., 2007; Hubbi et al., 2013) and has been widely studied in clear cell renal cell carcinoma (CCRCC), which is characterized by VHL inactivation and consequent constitutive normoxic activation of the HIF1 $\alpha$  (Gordan et al., 2007; Kaelin, 2008). In this line, a large proportion of CCRCCs harbor homozygous DNA deletions in the genomic region encompassing the *HIF1 $\alpha$*  locus, resulting in a loss of HIF1 $\alpha$  activity (Shen et al., 2011).

To enable cells to adapt to low-oxygen environments, HIF1 $\alpha$  increases glycolytic flux while simultaneously suppressing glucose-dependent TCA refilling and glucose-dependent citrate biosynthesis. Moreover HIF1 $\alpha$  facilitates the biogenesis of citrate from glutamine through reductive carboxylation to support cell proliferation in hypoxic conditions and upon TCA cycle impairment (Fendt et al., 2013; Metallo et al., 2011; Mullen et al., 2011; Wise et al., 2011). However, HIF1 $\alpha$  represses cell autonomous proliferation, which led us to hypothesize that HIF1 $\alpha$  could execute an additional metabolic control to override glutamine reductive carboxylation and therefore guarantee the suppression of cell proliferation. Indeed, HIF1 $\alpha$  acts not only as a repressor of aspartate biosynthesis through glutamine oxidation but also as a simultaneous repressor of later steps in the glutamine reductive carboxylation pathway involved in cytosolic aspartate generation. In this line, HIF1 $\alpha$  reduces the expression of key metabolic proteins involved in aspartate biogenesis, including the cytosolic and mitochondrial aspartate-producing enzymes GOT1 and GOT2. Significantly, aspartate supplementation suffices to relieve the suppression of cell proliferation upon HIF1 $\alpha$  activation, highlighting the importance of diminished aspartate biosynthesis for the tumor-suppressive potential of HIF1 $\alpha$ . In addition, we found that GOT1 and GOT2 are suppressed in VHL-deficient human renal carcinoma, for which HIF1 $\alpha$  executes its tumor-suppressive potential. By identifying a role of HIF1 $\alpha$  as a repressor of aspartate biosynthesis, we provide mechanistic insight into the molecular basis of its tumor-suppressor function through aspartate metabolic reprogramming.

## RESULTS

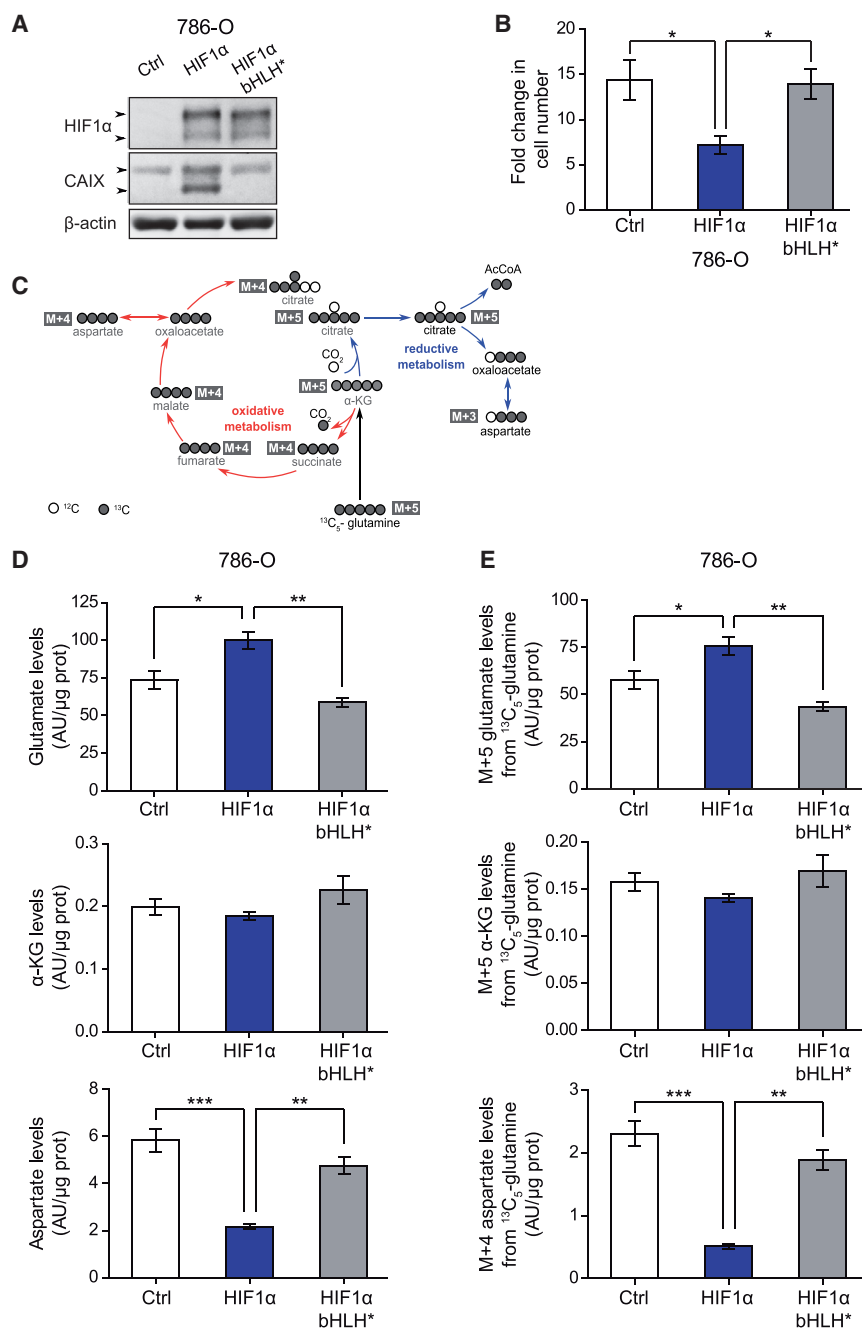
### HIF1 $\alpha$ Reduces Aspartate Generation through Glutamine Oxidation

The intracellular molecular mechanisms that control aspartate biosynthetic pathways remain largely unknown. We questioned whether HIF1 $\alpha$ , which acts as a suppressor of tumor cell proliferation, executes its antiproliferative effects through rewiring of aspartate metabolism. To unequivocally assess the role of HIF1 $\alpha$  in aspartate metabolism, we restored HIF1 $\alpha$  expression by transduction of a wild-type version of HIF1 $\alpha$  in 786-O cells (786-O-HIF1 $\alpha$  cells) and the corresponding control to generate 786-O-control cells as well as a mutant DNA-binding domain HIF1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$  bHLH\*), lacking transcriptional activity (786-O-HIF1 $\alpha$  bHLH\* cells) (Figure 1A). Of note, to avoid an excessive

ectopic HIF1 $\alpha$  expression, we restored HIF1 $\alpha$  to levels similar to endogenous HIF1 $\alpha$  in cells exposed to hypoxia (Figure S1A). We confirmed that HIF1 $\alpha$  was active in 786-O cells by measuring the expression of carbonic anhydrase IX (CAIX), a well-recognized HIF1 $\alpha$ -dependent gene in CCRCC (Raval et al., 2005). Accordingly, CAIX was expressed at higher levels in HIF1 $\alpha$ -transduced cells compared with both 786-O-HIF1 $\alpha$  bHLH\* and 786-O-control cells (Figure 1A). Moreover, ectopic expression of HIF1 $\alpha$ , but not HIF1 $\alpha$  bHLH\*, inhibited the proliferation rate of 786-O cells (Figure 1B), in line with the tumor-suppressive potential of HIF1 $\alpha$ .

Glutamine utilization has been shown to be relevant in CCRCC biology (Fendt et al., 2013; Gameiro et al., 2013; Metallo et al., 2011; Mullen et al., 2011; Shroff et al., 2015; Wise et al., 2011). Glutamine is first converted to glutamate by the enzyme glutaminase and is subsequently converted to  $\alpha$ -keto-glutarate ( $\alpha$ -KG) to replenish the TCA cycle, which permits aspartate biosynthesis through glutamine oxidation (Altman et al., 2016; Birsoy et al., 2015; Buescher et al., 2015; Lane and Fan, 2015; Sullivan et al., 2015). We next assessed the levels of total glutamate,  $\alpha$ -KG, and aspartate as well as the relative contribution of glutamine-dependent metabolism to the generation of these metabolites using  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine tracer analysis (Figure 1C) in 786-O cells upon HIF1 $\alpha$  activation. Our analysis showed an increase of total glutamate levels, while  $\alpha$ -KG was not significantly altered in 786-O-HIF1 $\alpha$  cells with respect to controls (Figure 1D). In sharp contrast, 786-O-HIF1 $\alpha$  cells showed a remarkable decrease in aspartate levels compared with control cells (Figure 1D). As outlined above, we also considered aspartate generation through glutamine oxidation, in which  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine is converted first to labeled M+5 glutamate and M+5  $\alpha$ -KG, which the latter is subsequently converted to M+4 aspartate through the TCA cycle (Figure 1C). The total content of M+5 glutamate was elevated, while M+5  $\alpha$ -KG generated from  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine was unchanged in 786-O-HIF1 $\alpha$  cells compared with control cells (Figure 1E). However, we observed a remarkable decrease in the total content of M+4 aspartate in 786-O cells upon HIF1 $\alpha$  activation (Figure 1E).

We next assessed whether this rewiring of aspartate biosynthesis also occurs in other cellular settings. Loss of HIF1 $\alpha$  has been largely investigated in VHL-deficient renal cell carcinoma cells, but deletions affecting chromosome 14q including *HIF1 $\alpha$*  locus have been also reported in other tumor types, such as melanoma (Shen et al., 2011). Along this line, we found a spontaneously occurring subclone of melanoma cell line (UCDMel) with homozygous deletions of specific exons in the *HIF1 $\alpha$*  locus (UCDMel- $\Delta$ H) (Figures S1B and S4G). In UCDMel- $\Delta$ H cells, we restored HIF1 $\alpha$  activity by expressing a version of HIF1 $\alpha$  lacking key proline hydroxylation P402 and P564 residues (HIF1 $\alpha$  (P2)\*) required for degradation in normoxia (Figure 2A). HIF1 $\alpha$  (P2)\* protein levels in UCDMel- $\Delta$ H cells were also comparable with endogenous HIF1 $\alpha$  levels in cells exposed to hypoxia (Figure S1A). As expected, HIF1 $\alpha$  (P2)\* expression induced CAIX expression (Figure 2A) and repressed cell autonomous proliferation compared with those cells expressing the mutant DNA-binding domain HIF1 $\alpha$  (P2)\* bHLH\* and the corresponding control cells (Figure 2B). Total levels of glutamate were elevated, while



**Figure 1. 786-O Cell Proliferation and Aspartate Biosynthesis through the Oxidative Pathway Are Repressed upon HIF1α Activation**

(A) Representative western blot analysis of HIF1α, CAIX, and β-actin protein levels in 786-O HIF1α, HIF1α bHLH\*, and control cells.

(B) Cell number fold increase of 786-O HIF1α, HIF1α bHLH\*, and control cells after 96 h (n = 6).

(C) Reductive versus oxidative glutamine metabolism on the basis of a <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamine tracer measured for α-KG, citrate, and aspartate. M+5 citrate and M+3 aspartate are indicative of reductive glutamine metabolism, whereas M+4 citrate and M+4 aspartate are indicative of oxidative glutamine metabolism. Gray circles represent <sup>13</sup>C-labeled carbons, whereas white circles represent unlabeled carbons.

(D) Total levels of glutamate, α-KG, and aspartate in 786-O HIF1α, HIF1α bHLH\*, and control cells (n = 3).

(E) Absolute amount of <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamate (M+5), <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-α-KG (M+5), and <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-aspartate (M+4) derived from <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamine in 786-O HIF1α, HIF1α bHLH\*, and control cells (n = 3).

Data are shown as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, and \*\*\*p < 0.001.

Overall, these data allow us to conclude that HIF1α represses intracellular aspartate levels and that this effect can be attributed, at least partly, to diminished glutamine-dependent aspartate biosynthesis through glutamine oxidation.

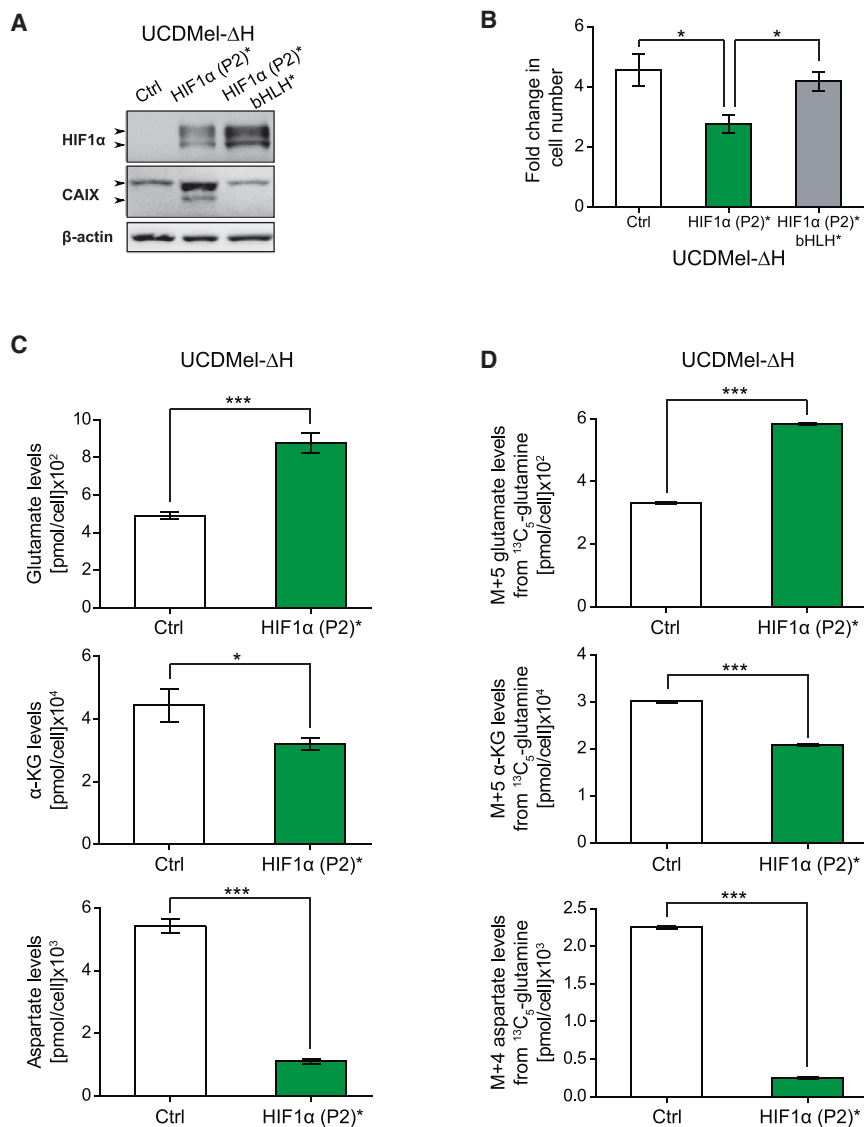
### HIF1α Represses Key Mitochondrial Proteins Involved in Aspartate Biosynthesis through Glutamine Oxidation

Aspartate biosynthesis through glutamine oxidation specifically requires the activity of GOT2, which converts oxaloacetate in the mitochondrion to aspartate (Birsoy et al., 2015; Coloff et al., 2016). We thus assessed whether HIF1α represses GOT2 expression. Western blot analysis showed that GOT2 expression was lower in 786-O-HIF1α cells than in 786-O-HIF1α

total α-KG levels were modestly diminished in UCDMel-ΔH-HIF1α (P2\*) cells compared with the corresponding control cells (Figure 2C). Importantly, similar to 786-O-HIF1α cells, aspartate levels were markedly lower compared with the corresponding control cells (Figure 2C). <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamine tracer analysis (Figure 1C) revealed that HIF1α (P2)\* expression elevates total content of M+5 glutamate while M+5 α-KG was modestly diminished (Figure 2D). However, we also observed a remarkable decrease in the total content of M+4 aspartate in UCDMel-ΔH cells upon HIF1α activation (Figure 2D).

bHLH\* mutant and 786-O-control cells (Figure 3A), and this was also found in UCDMel-ΔH-HIF1α (P2)\* cells (Figure 3B). The expression of other aminotransferases such as phosphoserine aminotransferase (PSAT1), in which α-KG generation is coupled to non-essential amino acids (Coloff et al., 2016), was unaltered or showed an opposite trend (Figures 3A and 3B and data not shown), suggesting that the effect of HIF1α is specific to GOT2. We also considered that GOT2 requires oxaloacetate as a substrate, which is generated from malate and fumarate in the TCA cycle. In this respect, the enrichment of M+4 fumarate





**Figure 2. HIF1 $\alpha$  Reduces Proliferation and Aspartate Biosynthesis through the Oxidative Pathway in UCDMel- $\Delta$ H Cells**

(A) Representative western blot analysis of HIF1 $\alpha$ , CAIX, and  $\beta$ -actin protein levels in UCDMel- $\Delta$ H HIF1 $\alpha$  (P2)\*, HIF1 $\alpha$  (P2)\* bHLH\*, and control cells. (B) Cell number fold increase of UCDMel- $\Delta$ H HIF1 $\alpha$  (P2)\*, HIF1 $\alpha$  (P2)\* bHLH\*, and control cells after 72 h (n = 6).

(C) Total levels of glutamate,  $\alpha$ -KG, and aspartate in UCDMel- $\Delta$ H HIF1 $\alpha$  (P2)\* and control cells (n = 3).

(D) Absolute amount of  $^{13}\text{C}_5$ -glutamate (M+5),  $^{13}\text{C}_5$ - $\alpha$ -KG (M+5), and  $^{13}\text{C}_4$ -aspartate (M+4) derived from  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine in UCDMel- $\Delta$ H HIF1 $\alpha$  (P2)\* and control cells (n = 3).

Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using two-tailed unpaired t test when comparing two groups and one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test when comparing three groups. \*p < 0.05 and \*\*\*p < 0.001.

HIF1 $\alpha$  activity in these VHL-deficient cells can also repress GOT2 and SDH-A expression. In this line, we also found that inhibition of HIF1 $\alpha$  in RCC4 cells by silencing of endogenous HIF1 $\alpha$  or restoration of VHL results in an increased expression of GOT2 and SDH-A (Figures S3C and S3D).

Collectively, these data show that constitutive normoxic HIF1 $\alpha$  activation, which acts as a tumor suppressor in VHL-deficient tumor cells, represses key proteins involved in glutamine oxidation-dependent aspartate biosynthesis such as GOT2.

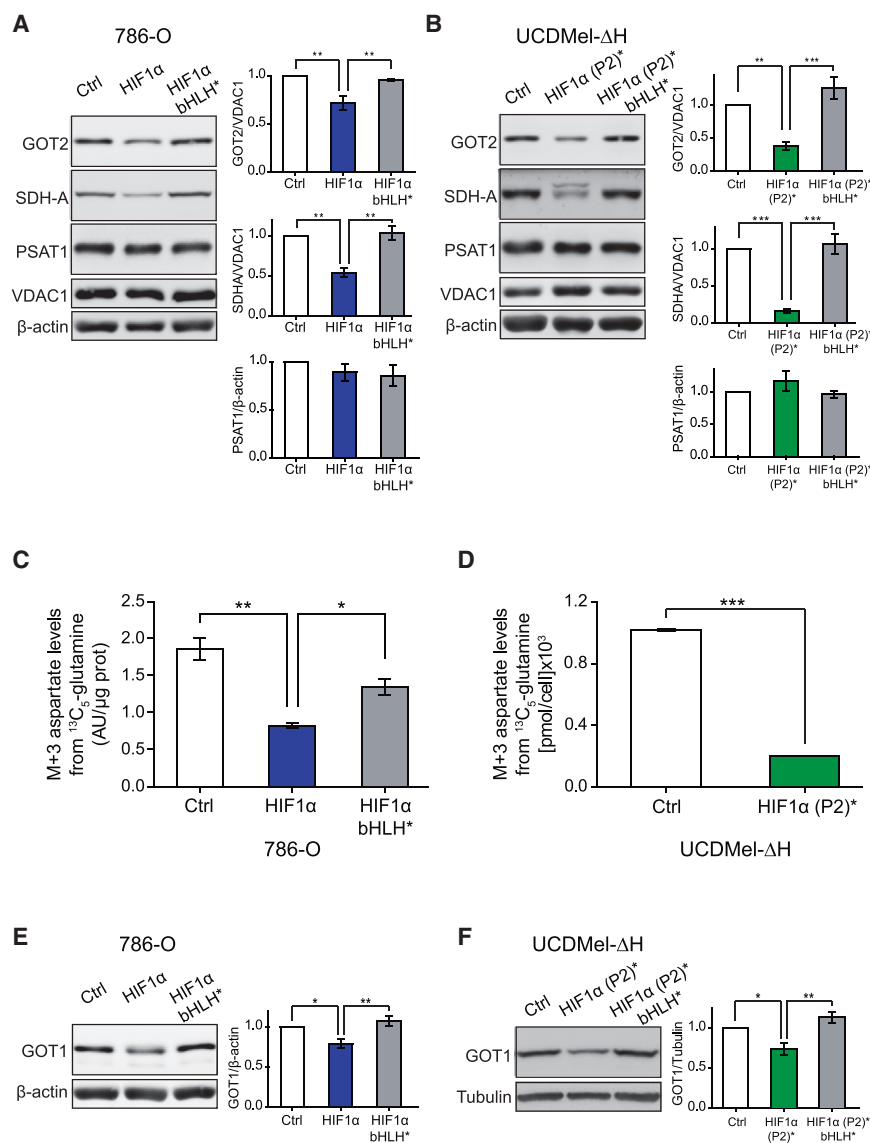
### HIF1 $\alpha$ Reduces Aspartate Biosynthesis through Reductive Glutamine Metabolism

Aspartate biosynthesis can also take place in the cytosol via the GOT1 amino-

transferase isoform, which requires oxaloacetate formed from citrate generated through reductive glutamine metabolism (Birssoy et al., 2015) (Figure 1C). Previous studies have shown that citrate generation through reductive glutamine metabolism is favored upon HIF1 $\alpha$  stabilization (Fendt et al., 2013; Gameiro et al., 2013; Metallo et al., 2011; Mullen et al., 2011; Wise et al., 2011). This shift to a reductive glutamine metabolism can be measured by the enrichment of M+5 citrate (generated through glutamine reductive carboxylation) relative to M+4 citrate (generated through glutamine oxidation). Indeed, an increased ratio of M+5 to M+4 citrate from  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine is indicative of a shift from an oxidative to a reductive glutamine metabolism (Lorendeau et al., 2017) (Figure 1C). In this line, both 786-O-HIF1 $\alpha$  and UCDMel- $\Delta$ H-HIF1 $\alpha$  (P2)\* cells showed significant increases in the enrichment of M+5 citrate relative to M+4 citrate in cells cultured in media containing  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine, confirming that both cell types favor reductive

and M+4 malate from  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine was also significantly decreased by HIF1 $\alpha$  activation in 786-O and UCDMel- $\Delta$ H cells (Figures S2A and S2B). In accordance with these data, we found that HIF1 $\alpha$  markedly repressed the expression of subunit A of succinate dehydrogenase (SDH-A), the mitochondrial complex II enzyme that converts succinate to fumarate in the TCA cycle (Figures 3A and 3B). Indeed, mitochondrial complex II activity in 786-O-HIF1 $\alpha$  cells was significantly lower compared with control cells (Figure S2C).

Consistent with these data, we found that normoxic expression of HIF1 $\alpha$  (P2)\* at levels similar to endogenous HIF1 $\alpha$  levels in hypoxia (Figure S1A) also repressed GOT2 and SDH-A expression in other cell lines, such as HeLa and SKOV3 (Figures S3A and S3B). In addition to VHL-deficient 786-O-like cells that lack endogenous HIF1 $\alpha$  expression, some other VHL-deficient cells such as the widely used RCC4 cells show constitutive endogenous HIF1 $\alpha$  expression. Therefore, we asked whether endogenous



**Figure 3. HIF1 $\alpha$  Represses Key Players Involved in Biosynthesis of Mitochondrial and Cytosolic Aspartate**

(A and B) Representative western blot analysis of GOT2, SDH-A, PSAT1, VDAC1, and  $\beta$ -actin protein levels and quantification in (A) 786-O HIF1 $\alpha$ , HIF1 $\alpha$  bHLH\*, and control cells (n = 4) and (B) UCDMel- $\Delta$ H HIF1 $\alpha$  (P2)\*, HIF1 $\alpha$  (P2)\* bHLH\*, and control cells (n = 7).

(C and D) Absolute amount of <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-aspartate (M+3) derived from <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamine (C) in 786-O HIF1 $\alpha$ , HIF1 $\alpha$  bHLH\*, and control cells (n = 3) and (D) in UCDMel- $\Delta$ H HIF1 $\alpha$  (P2)\* and control cells (n = 3).

(E and F) Representative western blot analysis of GOT1, tubulin, and  $\beta$ -actin protein levels and quantification (E) in 786-O HIF1 $\alpha$ , HIF1 $\alpha$  bHLH\*, and control cells (n = 5) and (F) in UCDMel- $\Delta$ H HIF1 $\alpha$  (P2)\*, HIF1 $\alpha$  (P2)\* bHLH\*, and control cells (n = 4).

Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using two-tailed unpaired t test when comparing two groups and one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test when comparing three groups. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, and \*\*\*p < 0.001.

in RCC4 cells as well as restoration of VHL increased GOT1 expression (Figures S4C and S4D). Finally, we explored whether HIF1 $\alpha$  controls GOT1 and GOT2 not only when constitutively expressed under normoxia, as is observed in VHL-deficient tumor cells, but also under hypoxia. To do this, we used G55 human glioma cells, which diminished their proliferation rate and showed reduced levels of GOT1 and GOT2 under hypoxia (Figures S4E and S4F). We then silenced endogenous HIF1 $\alpha$  to assess its role in the inhibition of cell proliferation and GOT1/2 expression in G55 cells under hypoxia. HIF1 $\alpha$  silencing was effective, as measured by the loss of hypoxic

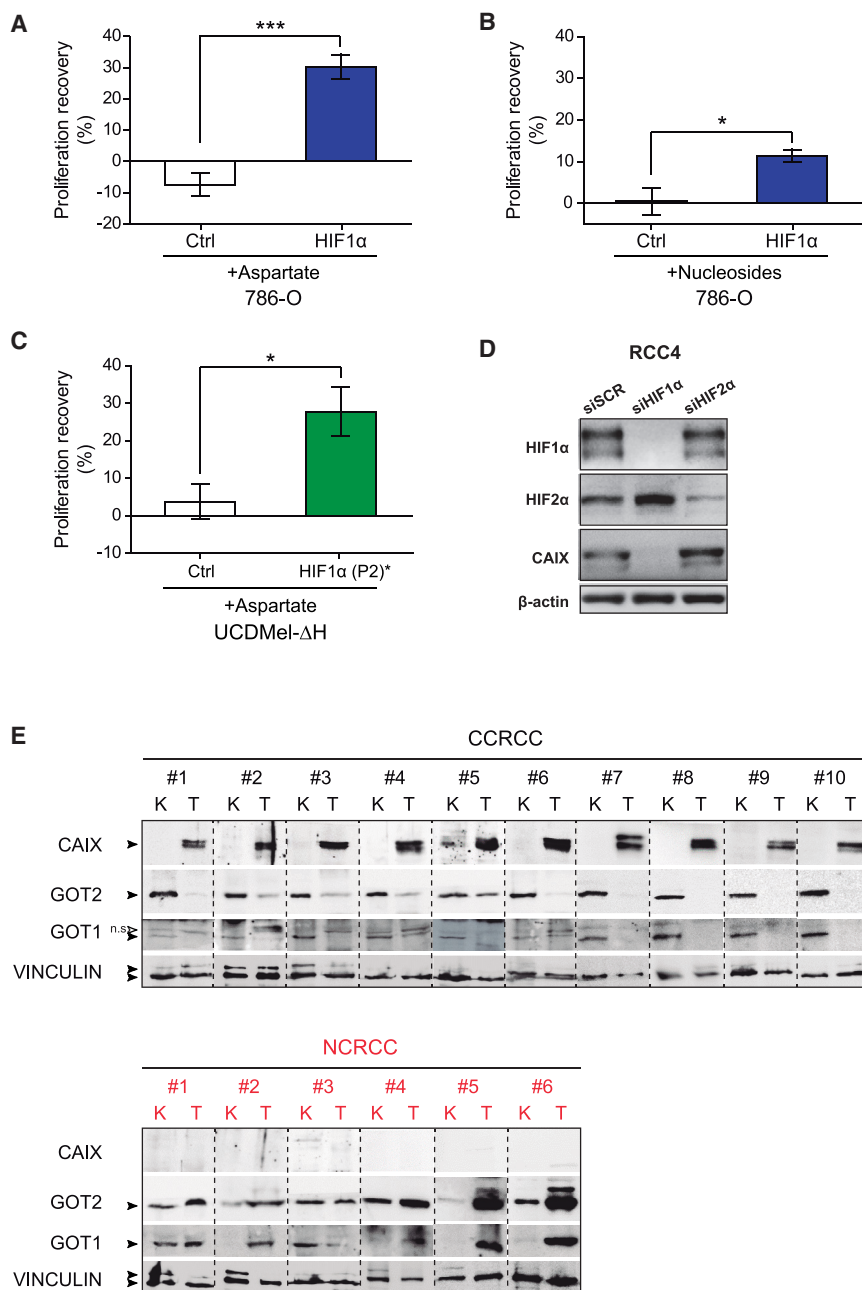
carboxylation pathway for citrate generation upon HIF1 $\alpha$  activation (Figures S2D and S2E). The reductive carboxylation pathway further converts M+5 citrate into M+3 aspartate (Figure 1C). However, our data show that the total content of M+3 aspartate from <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamine was markedly reduced in 786-O-HIF1 $\alpha$  cells as well as in UCDMel- $\Delta$ H-HIF1 $\alpha$  (P2)\* cells (Figures 3C and 3D).

Moreover, these findings suggest that HIF1 $\alpha$  can actively inhibit later steps of this reductive pathway required for cytosolic aspartate generation. Accordingly, we found that the expression of cytosolic GOT1 was decreased upon HIF1 $\alpha$  activation in 786-O-HIF1 $\alpha$  and UCDMel- $\Delta$ H-HIF1 $\alpha$  (P2)\* cells compared with their respective controls (Figures 3E and 3F). Suppression of GOT1 expression was also evident in HeLa and SKOV3 cells upon HIF1 $\alpha$  (P2)\* activation (Figures S4A and S4B). Furthermore, both silencing of endogenous HIF1 $\alpha$

CAIX expression (Figure S4F). Moreover, HIF1 $\alpha$  silencing relieved the hypoxia-dependent inhibition of G55 proliferation (Figure S4E) and, importantly, counteracted the hypoxia-dependent suppression of GOT1 and GOT2 expression (Figure S4F). In agreement with these data, hypoxia did not reduce GOT1 and GOT2 expression in UCDMel- $\Delta$ H cells, which, as mentioned earlier, lack HIF1 $\alpha$  activity and only induce the HIF2 $\alpha$  isoform (Figure S4G).

Our data suggest that HIF1 $\alpha$  reduces aspartate biosynthesis not only through inhibiting glutamine oxidation but also by attenuating reductive carboxylation, by repressing key players involved in these two aspartate biosynthetic pathways, such as GOT1 and GOT2. Therefore aspartate biosynthesis through reductive carboxylation upon HIF1 $\alpha$  activation cannot compensate for the decline of aspartate generation through glutamine oxidation shown in Figures 1E and 2D.





**Figure 4. Effect of Aspartate Supplementation on HIF1 $\alpha$ -Dependent Cell Proliferation Suppression and GOT1 and GOT2 Expression in Human Carcinoma Renal Samples**

(A and B) Effect of (A) aspartate supplementation (50  $\mu$ M) and (B) 1 $\times$  nucleosides mixture supplementation on 786-O HIF1 $\alpha$  and control cell proliferation after 96 h (n = 6).

(C) Effect of aspartate supplementation (5 mM) on UCDMel- $\Delta$ H HIF1 $\alpha$  (P2)\* and control cell proliferation after 72 h (n = 8).

(D) Representative western blot analysis of HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , CAIX, and  $\beta$ -actin protein levels in transient HIF1 $\alpha$ - and HIF2 $\alpha$ -silenced RCC4 cells and in their corresponding control cells.

(E) Western blot analysis of CAIX, GOT2, and GOT1 expression in CCRCCs (n = 10) (top) and NCRCCs (n = 6) (bottom) together with their corresponding paired healthy adjacent kidney tissue. NCRCC samples 1, 5, and 6 were histologically classified as chromophobe; samples 2 and 4 as oncocytoma; and sample 3 as papillary renal cell carcinoma. K, normal (healthy) kidney tissue; T, tumor tissue. Black arrowheads indicate specific western blot signals, whereas the white arrowhead indicates a nonspecific signal. Vinculin was used as a loading control. n.s., non-specific.

Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using two-tailed unpaired t test. \*p < 0.05 and \*\*\*p < 0.001.

### Aspartate Supplementation Recovers Cell Proliferation upon HIF1 $\alpha$ Activation

We next investigated whether intracellular aspartate decline upon HIF1 $\alpha$  activation might be enough to explain the antiproliferative effect of HIF1 $\alpha$ . Our earlier data showed that 786-O-HIF1 $\alpha$  cells had significantly lower levels of aspartate than control cells (Figure 1D). Importantly, the addition of extracellular aspartate at concentration of 50  $\mu$ M was sufficient to significantly stimulate the proliferation of 786-O-HIF1 $\alpha$  cells but did not affect the proliferation of corresponding control cells (Figure 4A). The ability of aspartate to foster proliferation partially relies on its abil-

ity to participate in the production of newly synthesized nucleotides. Consistent with this notion, we found that addition of a nucleoside mixture relieved the suppressed cell proliferation of 786-O-HIF1 $\alpha$  cells without any significant effect on the proliferation rate of control cells (Figure 4B). This relief in cell proliferation upon supplementation with nucleosides was lower than the effect of aspartate (compare Figures 4A and 4B), but aspartate is used not only for DNA synthesis but is also required for protein synthesis. It is thus conceivable that nucleosides have a lower potential to alleviate proliferation in HIF1 $\alpha$ -expressing cells than aspartate. Finally, we assessed whether aspartate could also counteract the antiproliferative potential of HIF1 $\alpha$  in UCDMel- $\Delta$ H cells. Aspartate supplementation also recovered the proliferation of UCDMel- $\Delta$ H-HIF1 $\alpha$  (P2)\* cells but without any significant effect on control UCDMel- $\Delta$ H cells (Figure 4C), which further demonstrate that the ability of aspartate to relieve proliferation is specifically manifested in HIF1 $\alpha$ -expressing cells.

Altogether, our data suggest that inhibition of aspartate biogenesis executed by HIF1 $\alpha$  provides a metabolic basis for its prominent role in suppressing autonomous cell proliferation in different cellular settings. Indeed, HIF1 $\alpha$  represses several key metabolic players, including GOT1 and GOT2, to ensure

the complete inhibition of aspartate biosynthesis through the glutamine reductive carboxylation and glutamine oxidation pathways.

### **GOT1 and GOT2 Are Profoundly Repressed in Human VHL-Defective CCRCC**

To evaluate the possible clinical implications of our data, we assessed the expression of GOT1 and GOT2 in CCRCC tumors, in which VHL activity is lost. We also included samples of non-clear renal cell carcinomas (NCRCC), which are renal carcinomas that retain VHL expression and accordingly are not characterized by constitutive HIF $\alpha$  activation. In total, we examined tissue samples from ten patients with CCRCC and six patients with NCRCC in parallel with adjacent healthy renal tissue from the same patient. As a specific control for HIF1 $\alpha$  activity in these tumors, we analyzed the expression of CAIX, which is specifically driven by HIF1 $\alpha$ , but not HIF2 $\alpha$ , in CCRCC cell lines such as RCC4 cells (Figure 4D) (Raval et al., 2005). Compared with healthy renal tissue, all the CCRCC samples analyzed showed elevated CAIX expression, whereas no CAIX expression was detectable in any of the NCRCC samples analyzed (Figure 4E). Importantly, GOT2 expression was repressed in all CCRCC samples, and GOT1 expression was also repressed in the majority (nine of ten) of these CCRCC samples (Figure 4E). In sharp contrast to the reduced expression of GOT1 and GOT2 in CCRCC, five of six NCRCC samples showed elevated GOT1 and GOT2 expression compared with adjacent healthy renal tissue (Figure 4E). Collectively, these findings further show that human CCRCC presents a profound and simultaneous repression of GOT1 and GOT2, highlighting the relevance of the HIF1 $\alpha$ -dependent regulation of these key players in aspartate biosynthesis in human tumors and, particularly, in VHL-deficient renal cell carcinomas. Moreover, these data underscore the clinical value of GOT1 and GOT2 repression to differentiate CCRCC and NCRCC renal cancers.

Overall, our data show that HIF1 $\alpha$  acts as a repressor of key mitochondrial and cytoplasmic players of aspartate biosynthesis, providing a metabolic basis for the suppression of tumor cell proliferation by HIF1 $\alpha$  in different biological settings, including VHL-deficient human carcinomas.

### **DISCUSSION**

Aspartate has been identified as a key metabolite for cell proliferation because of its role in nucleotide synthesis (Birsoy et al., 2015; Lane and Fan, 2015; Sullivan et al., 2015). In this study, we provide evidence that HIF1 $\alpha$  acts as a suppressor of tumor cell proliferation by controlling aspartate biosynthetic pathways. Importantly, HIF1 $\alpha$  suppresses key players required for aspartate biosynthesis through glutamine oxidation, such as GOT2 and SDH-A. Consistent with previous studies, we found that citrate generated through glutamine reductive carboxylation is favored upon HIF1 $\alpha$  activation (Fendt et al., 2013; Lorendeau et al., 2017; Metallo et al., 2011; Mullen et al., 2011; Wise et al., 2011) likely in an attempt to compensate for the reduced glucose-dependent citrate biosynthesis upon HIF1 $\alpha$  activation. However, we found that HIF1 $\alpha$  attenuates later steps in the glutamine reductive carboxylation pathway by suppressing key

players of this pathway involved in cytosolic aspartate generation, such as GOT1. It was recently shown that glutamine reductive carboxylation can contribute to aspartate generation in some VHL-deficient tumor cells (Okazaki et al., 2017). However, our data show not only that the glutamine reductive pathway does not compensate for the diminished aspartate generation through glutamine oxidation upon HIF1 $\alpha$  activation, but that HIF1 $\alpha$  actively limits aspartate biosynthesis through this reductive pathway involving suppression of cytosolic GOT1. Consequently, this simultaneous inhibition of oxidative and reductive pathways results in a remarkable decline in total aspartate upon HIF1 $\alpha$  activation. In addition, it should be also considered that the simultaneous impact of HIF1 $\alpha$  on GOT1 and GOT2 also might result into a repression on the malate-aspartate shuttle, because GOT1 also executes its well-recognized function in this shuttle by converting aspartate (generated by GOT2 in mitochondria) to oxaloacetate in the cytoplasm. Reduced glutamine oxidation metabolism can be compensated for in some tumor cells by an elevated activity of the shuttle that favors aspartate-dependent TCA cycle replenishment (Allen et al., 2016), and therefore the ability of HIF1 $\alpha$  to suppress both players in the shuttle will ensure its function as a tumor suppressor even in cellular scenarios characterized by compensatory malate-aspartate shuttle overactivation. Importantly the inhibition of GOT1/2 expression in HIF1 $\alpha$ -expressing cells was manifest not only in cellular *in vitro* settings but also in VHL-deficient human CCRCCs, which are characterized by sustained activation of HIF1 $\alpha$  but not in NCRCCs which lack constitutive HIF1 $\alpha$  activation. Thus, GOT1 and GOT2 repression represents a specific metabolic feature of CCRCC. These findings not only support the notion that the repressive HIF1 $\alpha$ -GOT1/2 pathway is operative *in vivo* in human tumors but also underscore the clinical value of our data to differentiate between CCRCC and NCRCC renal cancers. Finally it should also be stated that a recent metabolomic study of CCRCC found that these tumors have low aspartate levels (Hakimi et al., 2016), and *in vivo* studies showed glutamine metabolism to have a dominant role in sustaining CCRCC growth (Shroff et al., 2015). It is therefore plausible that HIF1 $\alpha$  counteracts glutamine-dependent metabolic pathways in order to act as a tumor suppressor in CCRCC.

Notably, the relevance of aspartate insufficiency imposed by HIF1 $\alpha$  tumor-suppressive activity was demonstrated by the fact that aspartate supplementation relieved HIF1 $\alpha$ -dependent suppression of cell proliferation. Cancer cells have limited ability to uptake aspartate compared with other metabolites (Birsoy et al., 2015; Garcia-Bermudez et al., 2018; Sullivan et al., 2015, 2018). In this line, previous studies have shown that aspartate is required at concentrations of 5–20 mM to restore proliferation of cells lacking mitochondrial activity (Birsoy et al., 2015; Sullivan et al., 2015). However, some tumor cell types show basal expression of the high-affinity aspartate transporter SLC1A3 to import aspartate, and therefore lower doses are sufficient to restore proliferation of these cells when mitochondrial activity is compromised (Garcia-Bermudez et al., 2018). In this study we found that aspartate doses required to increase proliferation in 786-O-HIF1 $\alpha$  cells are lower than in UCDMeI- $\Delta$ H cells, possibly related to the higher expression of SLC1A3 in 786-O than in UCDMeI- $\Delta$ H cells (data not shown). In agreement with

our data, it was shown that hypoxia reduces intracellular aspartate levels and that hypoxia-dependent suppression of cell proliferation can be recovered by aspartate supplementation (Garcia-Bermudez et al., 2018; Sullivan et al., 2018). However, it should be highlighted that these studies considered that oxygen insufficiency might restrict aspartate biosynthesis through a direct impairment of electron transport chain function, limiting the generation of electron acceptors required for aspartate synthesis. Our data show that the hypoxia-dependent suppression of aspartate metabolism is not necessarily a consequence of a direct impact on mitochondrial activity but importantly also requires the HIF1 $\alpha$  oxygen-sensing pathway that promotes multiple actions that compromise aspartate biosynthesis. Therefore these data show that HIF1 $\alpha$  pathway couples cellular oxygen supply and aspartate biosynthesis.

In summary, our study identifies HIF1 $\alpha$  as an inhibitor of aspartate biogenesis by repressing glutamine oxidation and reductive carboxylation pathways, effects that include the suppression of several metabolic players involved in aspartate production, such as GOT1 and GOT2. This pathway provides a molecular basis for the effect of HIF1 $\alpha$  in suppressing tumor cell proliferation that is operative in several biological settings, including human CCRCC, for which HIF1 $\alpha$  acts as a tumor suppressor.

## STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Cell cultures
  - Clinical material
- METHOD DETAILS
  - DNA constructs
  - Viral infection
  - siRNA-mediated gene silencing
  - Western blots and antibodies
  - Cell proliferation analysis
  - <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamine tracer analysis
  - Mitochondrial membranes isolation and SDH activity
  - Protein expression analysis of clinical material
  - Massive parallel sequencing
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.106>.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. W.G. Kaelin (Medical Oncology/Molecular and Cellular Department, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA) for providing the vectors encoding HIF1 $\alpha$  version with mutated P402 and P564 residues and the corresponding control. We would like to thank Sabien Gräf from the University of Giessen for excellent technical assistance. This work was supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2016-76815 and SAF2017-90794-REDT) and Fundació La Marató

de TV3 (534/C/2016). F.M.-R. is supported by Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2014-068618). A.A.U. is supported by the CAM “Atracción de Talento” program. D.L. is supported by the VIB-Marie Curie omics program. S.-M.F. acknowledges funding support from a Marie Curie CIG, FWO Odysseus II, FWO Research Grants, Eugene Yourassowsky Schenking, and KU Leuven Methusalem co-funding. O.R. has a contract for accessing the Spanish System of Science, Technology and Innovation (SECTI) funded by the University of Castilla-La Mancha (UCLM). R.S.P. acknowledges funding support from Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2015-64215-R) and Fundación Leticia Castillejo Castillo. A.M.-R. acknowledges funding support from Ministerio de Economía y Competitividad (PI15/00107). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.M.-R. and A.A.U. conducted most of the experiments. F.M.-R., A.A.U., S.-M.F., K.D.B., and J.A. were involved in the design of the experiments, data analysis, and writing the manuscript. C.M.-C., G.T., Q.O.Y.L., E. Fuertes, E.E., and K.D.B. helped with proliferation experiments. A.E., M.T.-C., D.T., and E. Fuertes helped with western blot and RNA analysis. A.B. and E. Fraga helped with aspartate supplementation experiments. D.L. and G.R. performed the <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamine dynamic tracer experiments and total intracellular metabolite level measurements. N.B.-S. and T.A. performed the analysis in hypoxia-exposed G55 cells. O.R., A.S.S.-S., J.M.G.-B., M.O.M., and R.S.P. helped with collection and western blot analysis of human samples of renal cell carcinoma. P.H.-A. and A.M.-R. helped with mitochondrial complex II activity measurements. B.P. helped with identification of HIF1 $\alpha$  locus deletions in UCD-Mel- $\Delta$ H cells.

## DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: September 6, 2017

Revised: January 21, 2019

Accepted: January 28, 2019

Published: February 26, 2019

## REFERENCES

- Allen, E.L., Ulanet, D.B., Pirman, D., Mahoney, C.E., Coco, J., Si, Y., Chen, Y., Huang, L., Ren, J., Choe, S., et al. (2016). Differential aspartate usage identifies a subset of cancer cells particularly dependent on OGDH. *Cell Rep.* **17**, 876–890.
- Altman, B.J., Stine, Z.E., and Dang, C.V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 619–634.
- Birsoy, K., Wang, T., Chen, W.W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., and Sabatini, D.M. (2015). An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis. *Cell* **162**, 540–551.
- Buescher, J.M., Antoniewicz, M.R., Boros, L.G., Burgess, S.C., Brunengraber, H., Clish, C.B., DeBerardinis, R.J., Feron, O., Frezza, C., Ghesquiere, B., et al. (2015). A roadmap for interpreting (13)C metabolite labeling patterns from cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **34**, 189–201.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., et al. (1998). Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**, 485–490.
- Coloff, J.L., Murphy, J.P., Braun, C.R., Harris, I.S., Shelton, L.M., Kami, K., Gygi, S.P., Selfors, L.M., and Brugge, J.S. (2016). Differential glutamate metabolism in proliferating and quiescent mammary epithelial cells. *Cell Metab.* **23**, 867–880.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, 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* 107, 43–54.
- Fendt, S.M., Bell, E.L., Keibler, M.A., Olenchok, B.A., Mayers, J.R., Wasylenko, T.M., Vokes, N.I., Guarente, L., Vander Heiden, M.G., and Stephanopoulos, G. (2013). Reductive glutamine metabolism is a function of the  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nat. Commun.* 4, 2236.
- Fernandez, C.A., Des Rosiers, C., Previs, S.F., David, F., and Brunengraber, H. (1996). Correction of  $^{13}\text{C}$  mass isotopomer distributions for natural stable isotope abundance. *J. Mass Spectrom.* 31, 255–262.
- Gameiro, P.A., Yang, J., Metelo, A.M., Pérez-Carro, R., Baker, R., Wang, Z., Arreola, A., Rathmell, W.K., Olumi, A., López-Larrubia, P., et al. (2013). In vivo HIF-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes VHL-deficient cells to glutamine deprivation. *Cell Metab.* 17, 372–385.
- García-Bermudez, J., Baudrier, L., La, K., Zhu, X.G., Fidelin, J., Sviderskiy, V.O., Papagiannakopoulos, T., Molina, H., Snuderl, M., Lewis, C.A., et al. (2018). Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nat. Cell Biol.* 20, 775–781.
- Gordan, J.D., Bertout, J.A., Hu, C.J., Diehl, J.A., and Simon, M.C. (2007). HIF-2 $\alpha$  promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 11, 335–347.
- Hakimi, A.A., Reznik, E., Lee, C.H., Creighton, C.J., Brannon, A.R., Luna, A., Aksoy, B.A., Liu, E.M., Shen, R., Lee, W., et al. (2016). An integrated metabolic atlas of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 29, 104–116.
- Hubbi, M.E., Kshitiz, Gilkes, D.M., Rey, S., Wong, C.C., Luo, W., Kim, D.H., Dang, C.V., Levchenko, A., and Semenza, G.L. (2013). A nontranscriptional role for HIF-1 $\alpha$  as a direct inhibitor of DNA replication. *Sci. Signal.* 6, ra10.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O $_2$  sensing. *Science* 292, 464–468.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., et al. (2001). Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O $_2$ -regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468–472.
- Kaelin, W.G., Jr. (2008). The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O $_2$  sensing and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 865–873.
- Kondo, K., Kim, W.Y., Lechpammer, M., and Kaelin, W.G., Jr. (2003). Inhibition of HIF2 $\alpha$  is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol.* 1, E83.
- Labrousse-Arias, D., Castillo-González, R., Rogers, N.M., Torres-Capelli, M., Barreira, B., Aragonés, J., Cogolludo, Á., Isenberg, J.S., and Calzada, M.J. (2016). HIF-2 $\alpha$ -mediated induction of pulmonary thrombospondin-1 contributes to hypoxia-driven vascular remodelling and vasoconstriction. *Cardiovasc. Res.* 109, 115–130.
- Lane, A.N., and Fan, T.W. (2015). Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* 43, 2466–2485.
- Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P.M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M.A., et al. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340, 1567–1570.
- Lorendeau, D., Rinaldi, G., Boon, R., Spincemaille, P., Metzger, K., Jager, C., Christen, S., Dong, X., Kuenen, S., Voordeckers, K., et al. (2017). Dual loss of succinate dehydrogenase (SDH) and complex I activity is necessary to recapitulate the metabolic phenotype of SDH mutant tumors. *Metab. Eng.* 43, 187–197.
- Mayers, J.R., and Vander Heiden, M.G. (2015). Famine versus feast: understanding the metabolism of tumors in vivo. *Trends Biochem. Sci.* 40, 130–140.
- Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarente, L., et al. (2011). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481, 380–384.
- Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.H., Sullivan, L.B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W.M., Chandel, N.S., and DeBerardinis, R.J. (2011). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 481, 385–388.
- Okazaki, A., Gameiro, P.A., Christodoulou, D., Laviollette, L., Schneider, M., Chaves, F., Stemmer-Rachamimov, A., Yazinski, S.A., Lee, R., Stephanopoulos, G., et al. (2017). Glutaminase and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors suppress pyrimidine synthesis and VHL-deficient renal cancers. *J. Clin. Invest.* 127, 1631–1645.
- Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., and Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5675–5686.
- Shen, C., Beroukhi, R., Schumacher, S.E., Zhou, J., Chang, M., Signoretti, S., and Kaelin, W.G., Jr. (2011). Genetic and functional studies implicate HIF1 $\alpha$  as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discov.* 1, 222–235.
- Shroff, E.H., Eberlin, L.S., Dang, V.M., Gouw, A.M., Gabay, M., Adam, S.J., Bellovin, D.I., Tran, P.T., Philbrick, W.M., Garcia-Ocana, A., et al. (2015). MYC oncogene overexpression drives renal cell carcinoma in a mouse model through glutamine metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112, 6539–6544.
- Sullivan, L.B., Gui, D.Y., Hosios, A.M., Bush, L.N., Freinkman, E., and Vander Heiden, M.G. (2015). Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells. *Cell* 162, 552–563.
- Sullivan, L.B., Luengo, A., Danai, L.V., Bush, L.N., Diehl, F.F., Hosios, A.M., Lau, A.N., Elmiligy, S., Malstrom, S., Lewis, C.A., and Vander Heiden, M.G. (2018). Aspartate is an endogenous metabolic limitation for tumour growth. *Nat. Cell Biol.* 20, 782–788.
- 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 O $_2$  tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 5510–5514.
- Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E., Cross, J.R., Gruber, J.J., Sachdeva, U.M., Platt, J.M., DeMatteo, R.G., Simon, M.C., and Thompson, C.B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108, 19611–19616.
- Yan, Q., Bartz, S., Mao, M., Li, L., and Kaelin, W.G., Jr. (2007). The hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  N-terminal and C-terminal transactivation domains cooperate to promote renal tumorigenesis in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2092–2102.
- Young, J.D., Walther, J.L., Antoniewicz, M.R., Yoo, H., and Stephanopoulos, G. (2008). An elementary metabolite unit (EMU) based method of isotopically nonstationary flux analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 686–699.



## STAR★METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Mouse monoclonal anti-HIF1 $\alpha$	BD Transduction Lab.	Cat#610959; RRID: AB_398272
Rabbit polyclonal anti-HIF2 $\alpha$	Abcam	Cat#ab199; RRID: AB_302739
Mouse monoclonal anti-CAIX	Santa Cruz Biotech.	Cat#sc-365900; RRID: AB_10846466
Mouse monoclonal anti-Tubulin	Sigma Aldrich	Cat#T6199; RRID: AB_477583
Monoclonal anti- $\beta$ -actin–peroxidase	Sigma Aldrich	Cat#A3854; RRID: AB_262011
Mouse monoclonal anti-Vinculin	Sigma Aldrich	Cat#V9264; RRID: AB_10603627
Rabbit polyclonal anti-VDAC1/Porin	Abcam	Cat#ab15895; RRID: AB_2214787
Rabbit polyclonal anti-GOT1	ProteinTech	Cat#14886-1-AP; RRID: AB_2113630
Rabbit polyclonal anti-GOT1	Novus Biologicals	Cat#NBP1-54778; RRID: AB_11006805
Rabbit polyclonal anti-GOT2	Sigma Aldrich	Cat#HPA018139; RRID: AB_1849903
Rabbit polyclonal anti-PSAT1	ThermoFisher	Cat#PA5-22124; RRID: AB_11153526
Rabbit monoclonal anti-SDH-A	Abcam	Cat#ab137040
<b>Biological Samples</b>		
Human renal carcinoma samples	Urology Department of the University Complex of Albacete	N/A
Healthy human renal samples	Urology Department of the University Complex of Albacete	N/A
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
Polybrene	Santa Cruz Biotech.	Cat#sc-134220
<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -glutamine	Sigma Aldrich	Cat#605166
L-aspartic acid	Sigma Aldrich	Cat#A7219
EmbryoMax® Nucleosides (100X)	Merck	Cat#ES-008-D
Phosphatase inhibitors	Sigma Aldrich	Cat#P5726
Protease inhibitors	Sigma Aldrich	Cat#P8340
<b>Experimental Models: Cell Lines</b>		
HEK293T	Provided by Dr. María J. Calzada	N/A
786-O	Provided by Dr. María J. Calzada	N/A
UCDMel- $\Delta$ H	This paper	N/A
HeLa	Provided by Dr. María J. Calzada	N/A
SKOV3	Provided by Dr. María J. Calzada	N/A
RCC4	Provided by Dr. María J. Calzada	N/A
G55	Provided by Dr. Till Acker	N/A
<b>Oligonucleotides</b>		
Control siRNA	Santa Cruz Biotech.	Cat#sc-37007
HIF1 $\alpha$ siRNA	Santa Cruz Biotech.	Cat#sc-35561
HIF2 $\alpha$ siRNA	Dharmacon	Cat#L-004814-00-0005
<b>Recombinant DNA</b>		
pLVX-TetOne-Puro-Luc	Takara	Cat#631849
pLVX-TetOne-HIF1 $\alpha$	This paper	N/A
pLVX-TetOne-HIF1 $\alpha$ bHLH*	This paper	N/A
pRV	<a href="#">Labrousse-Arias et al., 2016</a>	N/A
pRV-HIF1 $\alpha$ (P2)*	<a href="#">Labrousse-Arias et al., 2016</a>	N/A
pRV-HIF1 $\alpha$ (P2)* bHLH*	<a href="#">Labrousse-Arias et al., 2016</a>	N/A

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
pLVX	Takara	Cat#632159
pLVX-VHL	This paper	N/A
pGIPZ-shSCR	Dharmacon	Cat# RHS4346
pGIPZ-shHIF1 $\alpha$	Dharmacon	Cat# RHS4531-EG3091
Other		
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen	Cat#11668019
Dialyzed fetal bovine serum	Sigma Aldrich	Cat#F0392

**CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING**

Further information and requests for reagents may be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Julián Aragonés ([jaragones.hlpr@salud.madrid.org](mailto:jaragones.hlpr@salud.madrid.org)).

**EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

**Cell cultures**

The HEK293T, 786-O, UCDMel- $\Delta$ H, HeLa, SKOV3, RCC4 and G55 cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, HyClone, GE HealthCare) with the addition of 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 20 mM HEPES and 10% fetal bovine serum (FBS, Cultek). G55 cells were cultured in DMEM (ThermoFisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Merck). Cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air (normoxic conditions). To induce hypoxia, the cell culture dishes were placed at 0.5%–1% O<sub>2</sub> conditions. For supplementation assays, we used DMEM containing 10% dialyzed FBS (10,000 Mwt cut-off; F0392, Sigma), which was then supplemented with aspartate (A7219, Sigma-Aldrich) or a mixture of nucleosides (ES-008-D, Merck) when necessary.

**Clinical material**

Fresh human samples were obtained under the supervision of the pathologist and the local ethical committee from patients diagnosed and treated surgically at the Urology Department of the University Complex of Albacete, and without interfering with their histological evaluation. All cases were reviewed and diagnosed according to the criteria of the World Health Organization classification. Sample numbers are detailed in [Figure 4](#) and its figure legend.

Patient gender and age (years)

	#	Sex	Age (years)
<b>CCRCC</b>	1	Male	82
	2	Male	77
	3	Male	68
	4	Female	75
	5	Female	78
	6	Male	49
	7	Male	76
	8	Male	43
	9	Male	47
	10	Male	40
<b>NCRCC</b>	1	Female	52
	2	Male	53
	3	Male	59
	4	Male	73
	5	Female	42
	6	Female	63



## METHOD DETAILS

### DNA constructs

To generate 786-O cells stably expressing HIF1 $\alpha$ , we used a lentiviral vector pLVX-TetOne-Puro (Takara) harboring a wild-type version of HIF1 $\alpha$ , as well as pLVX-TetOne-Puro-Luc as its corresponding control vector. As an additional control, we utilized a lentiviral vector encoding HIF1 $\alpha$  bHLH\*, a version of HIF1 $\alpha$  into which we introduced a four amino acid substitution within the basic helix–loop–helix (bHLH) domain that impedes its transcriptional activity (similar to the four amino acid substitution previously introduced into HIF2 $\alpha$  (P2)\* (Kondo et al., 2003)). Cells were transduced and then selected with 1  $\mu$ g/ml puromycin (to obtain resistant polyclonal cell pools) and treated with 1  $\mu$ g/ml doxycycline (to induce the vector expression).

To generate UCDMel- $\Delta$ H, HeLa and SKOV3 cell lines stably expressing HIF1 $\alpha$ , we used a retroviral vector pRV encoding a mutated version of HIF1 $\alpha$  at positions P402 and P564 (HIF1 $\alpha$  (P2)\*), which therefore lacks critical proline residues and is therefore not recognized by VHL. Accordingly, this construct is constitutively active in normoxic conditions irrespective of the oxygen tension (Yan et al., 2007). In addition to the empty vector pRV, as an additional control, we utilized a retroviral vector encoding HIF1 $\alpha$  (P2)\* bHLH\*, a version of HIF1 $\alpha$  (P2)\* into which we introduced a four amino acid substitution within the basic helix–loop–helix (bHLH) domain that impedes its transcriptional activity (similar to the four amino acid substitution previously introduced into HIF2 $\alpha$  (P2)\* (Kondo et al., 2003)).

Lentiviral pLVX-VHL and pGIPZ-shHIF1 $\alpha$  vectors and their corresponding pLVX and pGIPZ-shSCR (Dharmacon) control vectors were used to generate stable transfectants of RCC4 cells. Cells were transduced and then selected with 1  $\mu$ g/ml puromycin to obtain resistant polyclonal cell pools.

### Viral infection

For retroviral infection, HEK293T cells seeded in p60 plates were transfected with 4  $\mu$ g of each retroviral vector and 4  $\mu$ g of the pCL-Ampho Retrovirus Packaging Vector (Imgenex) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cell culture supernatants were harvested 24 hours after transfection, filtered through a 0.45  $\mu$ m filter, diluted (1:2) with fresh medium containing 8  $\mu$ g/ml polybrene (final concentration) and added to the corresponding cells. This step was repeated on the next 2 days. For lentiviral infection, HEK293T cells seeded in p60 plates were transfected with 1.3  $\mu$ g of pLP1, 0.9  $\mu$ g of pLP2, 1.1  $\mu$ g of VSVg and 3.3  $\mu$ g of each lentiviral vector, following the same protocol as for retroviral infection.

### siRNA-mediated gene silencing

The siRNA experiments were carried out using HIF1 $\alpha$  siRNA (sc-35561, Santa Cruz Biotechnology), HIF2 $\alpha$  siRNA (L-004814-00-0005, Dharmacon) and control siRNA (sc-37007, Santa Cruz Biotechnology). RCC4 cells seeded in p60 plates were transfected with 60 nM of the corresponding siRNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 72 hours post-transfection, cells were collected and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until processing for western blot analysis.

### Western blots and antibodies

Cells were lysed in Laemmli buffer. Proteins were resolved in 8% or 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to 0.45  $\mu$ m nitrocellulose membranes. The membranes were blocked and probed with antibodies against: HIF2 $\alpha$  (ab199, Abcam); HIF1 $\alpha$  (610959, BD Transduction Laboratories); tubulin (T6199, Sigma);  $\beta$ -actin (A3854, Sigma); VDAC1/Porin (ab15895, Abcam); GOT2 (HPA018139, Sigma Aldrich); GOT1 (14886-1-AP, ProteinTech); PSAT1 (PA5-22124, Thermo Fisher); SDH-A (ab137040, Abcam); and CAIX (sc-365900, Santa Cruz Biotechnology). Immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence (Clarity, BioRad; and Super-Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific) and visualized on a digital luminescent image analyzer (Image Quant LAS4000 Mini; GE Healthcare).

### Cell proliferation analysis

For cell proliferation assays, 40,000 UCDMel- $\Delta$ H cells or 20,000 786-O cells were seeded per well in 6-well plates. After 72 hours for UCDMel- $\Delta$ H cells or 96 hours for 786-O cells, they were trypsinized and collected in the medium and live cells per well were counted manually with Neubauer Chamber.

For cell proliferation recovery assays with UCDMel- $\Delta$ H and 786-O cells, after 6 hours from seeding them, the medium was changed to medium supplemented with dialyzed FBS and with or without aspartate (5 mM or 50  $\mu$ M, respectively) or a mixture of nucleosides (1x working concentration). Then cells were grown for a further 72 or 96 hours and collected and counted as described before. Data were expressed as the percentage of proliferation recovery relative to equivalent cells cultured in non-supplemented medium.

G55 (30,000 cells) were seeded per well in 12-well plate. After 6 days later, cells were trypsinized and collected in the medium, and live cells per well were counted by CASY (OMNI Life Science).

### $^{13}\text{C}_5$ -glutamine tracer analysis

The  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine tracer (Sigma-Aldrich) was added to cells grown to confluency. The medium was changed for unlabeled medium 1 hour before adding the  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine medium. Cells were exposed to  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine in medium containing dialyzed FBS for 4 hours, after which time the metabolites were extracted. Control cells were maintained in unlabeled media in parallel to determine

the cell numbers. Metabolites for mass spectrometry (MS) analysis were prepared by quenching the cells in liquid nitrogen and then performing a cold, two-phase, methanol-water-chloroform extraction (Lorendeau et al., 2017), followed by centrifugation at 4°C to achieve phase separation. The methanol-water phase containing polar metabolites was separated and dried in a vacuum concentrator, and then stored at –80°C. Polar metabolites were derivatized for 90 minutes at 37°C with 7.5  $\mu\text{L}$  of 20  $\text{mg mL}^{-1}$  methoxyamine in pyridine and subsequently, for 60 minutes at 60°C with 15  $\mu\text{L}$  of *N*-(tert-butylidimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide, with 1% tert-butylidimethylchlorosilane (Lorendeau et al., 2017). Isotopomer distributions and metabolite concentrations were measured on a 7890A GC system (Agilent Technologies) combined with a 5975C Inert MS system (Agilent Technologies). The samples (1  $\mu\text{L}$ ) were injected onto a DB35MS column in splitless mode using an inlet temperature of 270°C. The carrier gas was helium with a flow rate of 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Upon injection, the GC oven was held at 100°C for 3 minutes and then ramped to 300°C with a gradient of 2.5°C  $\text{min}^{-1}$ , followed by a 5 minute after run at 320°C. The MS system was operated under electron impact ionization at 70 eV and a mass range of 100–650 amu was scanned. Isotopomer distributions were extracted from the raw ion chromatograms using a custom MATLAB M-file that applies consistent integration boundaries and baseline correction to each ion (Young et al., 2008). In addition, we corrected for naturally occurring isotopes (Fernandez et al., 1996) and for potential metabolite contamination using a blank extraction. All labeling fractions were transformed to a natural abundance corrected mass distribution vector (MDV: (Buescher et al., 2015)). Negative values were considered as zero. Each metabolite was measured in  $n = 3$  biological replicates. The aforementioned script also provides information about the total abundance of each metabolite in arbitrary units. Specifically, areas under the metabolite peak were normalized the internal standards norvaline or glutarate, as well as cell number or protein content. Conversion to absolute abundance in pmol was based on standard curves of known metabolite concentration.

### Mitochondrial membranes isolation and SDH activity

Mitochondria were isolated from 786-O HIF1 $\alpha$  and HIF1 $\alpha$  bHLH\* cells as well as from their corresponding 786-O control cells following a protocol adapted for cell culture (Lapiente-Brun et al., 2013). Briefly, after resuspending cells with a sucrose buffer in a glass Elvehjem potter, homogenization was performed by up and down strokes using a motor-driven Teflon pestle. Successive homogenization-centrifugation steps yielded the mitochondria-containing fraction. Mitochondrial membranes were obtained after freezing isolated mitochondria.

Succinate dehydrogenase (complex II) activity was measured by recording changes in absorbance at 600 nm in a buffer (25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM KCN and 2.5 mg/ml BSA, pH 7.2) containing 50–100  $\mu\text{g}$  mitochondrial membranes, 10 mM succinate, 5  $\mu\text{M}$  2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP), 2  $\mu\text{g/ml}$  antimycin A, 5  $\mu\text{M}$  rotenone and 130  $\mu\text{M}$   $\text{CoQ}_1$ .

### Protein expression analysis of clinical material

Kidney tumor and adjacent healthy tissue fresh samples were obtained in the surgery room and embedded in Optimal Cutting Temperature (OCT) medium introducing in isopentane at –80°C. Samples were maintained at –80°C until the sample was processed. Samples were cutted in pieces of 25  $\mu\text{m}$  with a cryostat microtome. Protein extraction was realized from 15 sections. First, 1 mL of water was added to the OCT embedded samples, and incubated 15 minutes on ice. Samples were centrifuged in a microcentrifuge 2 minutes at 10,000 rpm at 4°C. Lysis buffer (100 mM HEPES, pH 7.5; 50 mM NaCl; 0.1% Triton X-100; 5 mM EDTA; 0.125 M EGTA, protease (P8340, Sigma) and phosphatase inhibitors cocktail (P5726, Sigma)) were added to the pellet and tissue was disgregated with a plunger. Afterward, samples were shaken at 4°C for 30 minutes, and followed up by 15 minutes centrifugation at 4°C at 12000 rpm. Supernatant containing the protein was collected.

Indicated amounts of protein were loaded onto 10% SDS-PAGE, transferred to PVDF filters and blotted against different proteins using antibodies against GOT2 (HPA018139, Sigma Aldrich); GOT1 (NBP1-54778, Novus); CAIX (H120, Santa Cruz Biotechnology) and Vinculin (9264, Sigma-Aldrich). Western blotting against Vinculin was performed as loading control.

### Massive parallel sequencing

Genomic DNA extracted from UCDMe1- $\Delta\text{H}$  cells and healthy control fibroblasts was examined using the Illumina® Clinical-Exome Sequencing TruSight One Gene Panel. This panel includes all the known disease-associated genes described in the OMIM database until 2013, and captures 62,000 exons and their flanking intronic regions. After sequencing on a Nextseq500 platform, the reads were aligned with the reference genome and the depth of coverage of the *HIF1 $\alpha$*  gene was analyzed in order to detect genomic rearrangements.

## QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical details of experiments including statistical tests used, exact value of  $n$ , dispersion and precision measures (mean  $\pm$  SEM) and statistical significance are reported in the Figures and Figure Legends. The differences between 2 groups with similar variances were analyzed using a two-tailed Student's  $t$  test. When the variances of the groups were significantly different, a two-tailed  $t$  test with Welch's correction was used. Differences between the variances of the groups were analyzed with the Fisher test ( $F$ -test). When more than 2 groups were analyzed, statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. A  $p$  value lower than 0.05 was considered significant.