



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

MECANISMOS DE CONTROL DE LA LOCALIZACIÓN  
SUBCELULAR DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA  
DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* “SIMILAR”

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES EN EL ÁREA: CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAXIMILIANO IRISARRI

DIRECTOR DE TESIS: DR. PABLO WAPPNER

CONSEJERO DE ESTUDIOS: DR. PABLO WAPPNER

LUGAR DE TRABAJO: INSTITUTO LELOIR

BUENOS AIRES, 2007

# MECANISMOS DE CONTROL DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* “SIMILAR”

## Resumen

El homólogo de HIF- $\alpha$  en *Drosophila melanogaster*, Sima, está localizado principalmente en el citoplasma en normoxia y se acumula en el núcleo en hipoxia. A lo largo de esta tesis hemos caracterizado el mecanismo que regula la localización subcelular de Sima. Encontramos que Sima presenta un movimiento continuo entre el núcleo y el citoplasma, el cual depende de los niveles de oxígeno, de parámetros del desarrollo y del receptor de exportación nuclear CRM1. La importación nuclear depende de una secuencia de localización nuclear (NLS) bipartita atípica que mapea en la región C-terminal de la proteína. Identificamos una señal de exportación nuclear (NES) dependiente de CRM1 dentro del ODDD (dominio de degradación dependiente de oxígeno) de Sima que media su exportación hacia el citoplasma. Determinamos además que la hidroxilación dependiente de oxígeno de una prolina específica (P850) dentro del ODDD y el factor supresor de tumores de Von Hippel-Lindau (VHL) son necesarios para la exportación nuclear de Sima por parte de CRM1. Proponemos que la localización subcelular de HIF $\alpha$ /Sima es el resultado de un equilibrio dinámico entre importación y exportación nuclear, estando la exportación nuclear regulada por la tensión de oxígeno. Estos resultados en conjunto permiten postular que la maquinaria involucrada en la degradación de HIF- $\alpha$ /Sima es también necesaria para la regulación de su localización subcelular. Proponemos además que la localización subcelular de HIF- $\alpha$ /Sima es el resultado de un equilibrio dinámico entre importación y exportación nuclear, estando la exportación nuclear regulada por niveles de oxígeno.

**Palabras Claves:** Sima, hipoxia, *Drosophila*, importación nuclear, exportación nuclear, CRM1, VHL, prolil hidroxilasa, Fatiga, localización subcelular.

# REGULATION OF SUBCELLULAR LOCALIZATION OF THE HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR *DROSOPHILA MELANOGASTER* HOMOLOGUE “SIMILAR”

## Abstract

The *Drosophila* HIF $\alpha$  homologue Sima is localized mainly in the cytoplasm in normoxia, and accumulates in the nucleus in hypoxia. In this study we have explored the mechanism of oxygen-dependent regulation of Sima subcellular localization. We found that Sima shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm and that subcellular localization depends on oxygen levels, developmental parameters and on the nuclear export receptor CRM1. We found that Sima nuclear import is mediated by an atypical bipartite Nuclear Localization Sequence (NLS), localized next to the C-terminal end of the protein. We identified Nuclear Export Signals (NES) in the Sima Oxygen-Dependent Degradation Domain (ODDD), which contributes to Sima nuclear export. CRM1-dependent export requires both oxygen-dependent hydroxylation a specific prolyl residue in the ODDD (P850), and the activity of the Von Hippel-Lindau tumor suppressor factor (VHL). We thus conclude that the cellular machinery previously reported to be involved in HIF $\alpha$ /Sima degradation is also required for their subcellular localization. We propose that HIF $\alpha$ /Sima nucleocytoplasmic localization is the result of a dynamic equilibrium between nuclear import and nuclear export, and that nuclear export is modulated by oxygen tension.

**Keywords:** Sima, hypoxia inducible factor, *Drosophila*, nuclear import, nuclear export, CRM1, VHL, prolyl hydroxylase, Fatiga, subcellular localization.

*Esta tesis se la dedico a mi mujer, que con su apoyo, comprensión y cariño incondicional hizo posible el llevar adelante esta etapa de mi vida.*

*Esta tesis y todo lo vivido en ese tiempo es el resultado de un caminar y crecer juntos que tuvo punto de partida en aquella reunión que preparamos juntos.*

*Muchas gracias amor por acompañarme, siempre una parte de mi corazón va a ser tuya.*

*Esta tesis es un reconocimiento a toda mi familia, que siempre estuvieron y estimularon mi crecimiento tanto en el plano personal como en el profesional. A la memoria de mi padre, que hizo de su vida un ejemplo de lucha por sus ideales y metas, manteniendo siempre el respeto y el cariño a la gente que lo rodeaba. A mi mamá, que con su trabajo, sacrificio y entrega aún a expensas de su bienestar me enseñó el significado de la palabra misericordia. A Jime porque siempre supo con su cariño y sus palabras acompañar mi crecimiento. A la petiza porque siempre tuvimos una conexión especial y fuimos compinches de la vida. A mis abuelos, Porota y Carlos, porque siempre en silencio estuvieron alrededor de nosotros cuidándonos, y apoyándonos incondicionalmente. Gracias Porota por ser una abuela con todas las letras, siempre con la puerta abierta de tu casa y haciendo cosas para nosotros; nunca voy a olvidar tus comidas, scones, tortas, pizzas y empanadas. Gracias Carlos por el orgullo que siento por ser tu nieto, por la alegría que me genera cada vez que repasamos toda tu historia y como desde tu cargo público supiste ayudar a un montón de gente que lo necesitaba. A mis padrinos, Marta y Leo, de los cuales recibo en forma constante su cariño; ellos siempre me acompañaron en mi vida y nunca van a dejarme de sorprender. A Gustavo Etman, a quien no me va alcanzar la vida para agradecerte lo que hizo por nosotros en esos días tan difíciles; si bien la vida se llevó a mi viejo, se encargó de regalarme a un Gustavo.*

*A mis amigos de Babía -Ice, Chacha, Topo, Negro, Jo y Laura- que la distancia no hizo más que incrementar y fortalecer nuestra amistad. A ellos, que los conozco y quiero desde la secundaria, gracias por estar.*

*A mis amigos porteños -mum, turco, charo, enzo, mery, pitu, luli, lean, coty y vanne- que hicieron de la capital mi segundo hogar, a los que quiero como a mis hermanos. Gracias por su amistad y cariño. Gracias Jimún por tus largas caminatas alrededor del Parque Centenario, por tu amistad incondicional y por enseñarme a entender a mi corazón. A Lean porque el valor de su amistad es incalculable, porque siempre estuviste y vas a estar: “vamos a estar siempre juntos”.*

*A los amigos del lab Lachi, Marian y Andrés que con su alegría y compañerismo hicieron de lo cotidiano algo memorable. A la nueva gente que se incorporó -Amaranta, Juli, Juancito, Joel y Agos- que con su cariño supieron llevar adelante el espíritu del laboratorio.*

*A los amigos del pasillo del Instituto -Caro, Paz, Axel, Gaby, Oddo, Clau, Baez, Loschi, Lean, Alonso, Cordobes, Gastón, Caffé, Santi, Fede, Rodo, Clara, Mariana, Mariela, Cari, Ezequiel, Vero, Ale y Martín (por dos)- fuente constante de conocimiento, imposible no mencionarlos por su abrazos, cariño y alegría. Un agradecimiento particular a Rodolfete por su aparición salvadora en momentos difíciles.*

*El trabajo de tesis que aquí se presenta fue enteramente realizado en el laboratorio “112” del Dr. Pablo Wappner, en el Instituto Leloir. Quisiera agradecer a mi director Pablo que me dio la posibilidad de trabajar en su laboratorio, de viajar y desarrollar este trabajo de tesis con amplia libertad.*

*A mis compañeros de laboratorio, porque gracias a su compañerismo y predisposición a discutir los resultados, tuvieron mucho que ver en el desarrollo de esta tesis. Un agradecimiento particular a Silvia, quien fuera mi primer mentor en el campo de la Biología Molecular y a Sofía, quien sentó las bases para mi trabajo.*

*Fuera del laboratorio pero dentro del grupo de moscólogos, debo agradecer a la Dra. Fernanda Ceriani y a su laboratorio por las reuniones en conjunto y el espacio para la discusión de resultados. Así como también porque han hecho del cuarto de moscas un lugar cálido y agradable a pesar de ser oscuro y frío.*

*Al Instituto Leloir, con todos los investigadores, becarios y técnicos que lo forman, por darme el espacio de conocimiento y crítica necesario para nutrirme y desarrollar esta tesis. Y a todo su personal: mantenimiento, autoclave, biblioteca, recepción, soporte informático y secretaría, por hacer posible con su trabajo nuestro trabajo.*

*Por último quisiera agradecer a los organismos gubernamentales que hicieron posible realizar la presente tesis doctoral: al Consejo Nacional de Investigadores Científicas y Técnicas (CONICET), quien financió mi actividad en el laboratorio, y a la Universidad de Buenos Aires.*

---

I) INTRODUCCIÓN.	1.
EL OXÍGENO COMO FUENTE DE ENERGÍA.	2.
RESPUESTA A HIPOXIA EN LOS MAMÍFEROS.	3.
1. Inducción transcripcional en respuesta a hipoxia.	3.
2. Un factor de transcripción responsable de la inducción por hipoxia.	4.
3. Un factor de transcripción pleiotropico en cada célula.	5.
4. Diferentes subunidades alfa de HIF.	7.
5. Regulación de HIF.	8.
5.a) Estabilidad proteica de HIF-1 $\alpha$ .	8.
5.a.1) <i>El sistema Ubiquitina-Proteasoma.</i>	9.
5.a.1.1) Ubiquitina.	9.
5.a.1.2) La ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$ depende del gen supresor de tumores de von Hippel-Lindau.	11.
5.a.2) <i>Dominio de degradación dependiente de oxígeno de HIF-1<math>\alpha</math>.</i>	12.
5.a.3) <i>Un sensor molecular de oxígeno que regula la estabilidad de HIF-<math>\alpha</math>.</i>	13.
5.b) Reclutamiento de co-activadores.	16.
5.b.1) <i>Un dominio de activación transcripcional en la región carboxilo-terminal de HIF-1<math>\alpha</math>.</i>	16.
5.b.2) <i>Co-activadores transcripcionales de HIF-1<math>\alpha</math>.</i>	17.
5.b.3) <i>Un segundo sistema de sensado de oxígeno.</i>	17.
5.c) Localización subcelular de HIF-1 $\alpha$ .	18.
5.d) Isoformas dominante negativas de HIF.	19.
5.e) Otros mecanismos de regulación de la actividad de HIF.	20.
RESPUESTA A HIPOXIA EN <i>Drosophila melanogaster</i> .	21.
6. <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema modelo.	21.
7. Ciclo de vida.	21.
8. Respuesta a hipoxia en <i>Drosophila</i> .	23.
8.a) En <i>Drosophila</i> existe una respuesta hipoxia similar a la de mamíferos.	23.
8.b) Activación del sistema Sima/Tango en embriones.	23.
8.c) Regulación de Sima por el oxígeno.	24.
8.c.1) <i>Estabilidad proteica.</i>	24.
8.c.2) <i>Splicing alternativo del gen sima.</i>	25.
8.c.3) <i>Regulación de la localización subcelular de Sima.</i>	27.
8.c.4) <i>Otros mecanismos que contribuyen a la</i>	



---

<i>regulación de Sima.</i>	27.
II) HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.	28.
III) MATERIALES Y MÉTODOS.	30.
1. Construcciones de ADN.	31.
1.a) Construcciones empleadas en células S2.	31.
1.b) Construcciones empleadas en líneas transgénicas de <i>Drosophila</i> .	32.
1.b.1) <i>Construcciones de Sima.</i>	32.
1.b.1.1) Formas delecionadas de Sima.	32.
1.b.1.2) Formas mutantes de Sima.	33.
1.b.2) <i>Otras construcciones.</i>	35.
2. Transfección de células S2 con proteínas de fusión a EGFP.	36.
3. Líneas de moscas utilizadas.	36.
4. Moscas transgénicas.	36.
5. Mapeo de las líneas transgénicas.	37.
6. Recombinación homóloga.	38.
7. Mantenimiento de Stocks.	39.
8. Recolección sincronizada de embriones, tratamientos de hipoxia y pulsos de calor.	39.
9. Inmunofluorescencia de embriones.	39.
10. Hibridización in situ de ARNs mensajeros.	40.
11. Estudios de la localización subcelular de Sima durante la re-oxigenación.	41.
12. Análisis de la localización subcelular de las fusiones a EGFP en células S2 de <i>Drosophila</i> .	42.
13. Análisis de la localización subcelular de variantes de Sima en embriones de <i>Drosophila</i> .	42.
13.a) En estado de equilibrio.	42.
13.b) Ensayos de re-oxigenación.	42.
IV) RESULTADOS.	43.
1. Regulación de la Estabilidad Proteica de Sima.	44.
1.a) Identificación del dominio de degradación dependiente de oxígeno de Sima.	44.
1.b) Identificación de los Residuos de Prolina que controlan la estabilidad de Sima.	48.
2. Regulación de la Localización Subcelular de Sima.	49.
2.a) Estrategia Experimental.	49.

2.b.) La localización subcelular de Sima depende de los niveles de oxígeno y del estadio embrionario.	50.
2.c.) Sima presenta un movimiento continuo entre el núcleo y el citoplasma y su exportación nuclear está mediada por CRM1/Embargoed.	52.
2.c.1) <i>Identificación de una señal de localización nuclear funcional en la secuencia de Sima.</i>	52.
2.c.2) <i>Caracterización de la señal de localización nuclear de Sima.</i>	55.
2.c.3) <i>Señales de Exportación Nuclear localizadas en el ODDD de Sima.</i>	56.
2.c.4) <i>Identificación de la NES del ODDD mediante fusiones a EGFP.</i>	59.
2.c.5) <i>Efecto de la NES del ODDD en el contexto de la proteína entera.</i>	61.
2.c.5.a) Localización subcelular de Sima en el equilibrio.	61.
2.c.5.b) Cinética de exportación de Sima mutada en la NES del ODDD en ensayos de re-oxigenación.	62.
2.c.6) <i>Participación del exportador nuclear CRM1/embargoed en la regulación de la localización subcelular de Sima.</i>	63.
2.c.6.a) Experimentos de pérdida de función.	63.
i. <i>Efecto sobre la localización de Sima en el equilibrio.</i>	66.
ii. <i>Efecto de la pérdida de función de embargoed sobre la cinética de exportación de Sima tras la re-oxigenación de los embriones.</i>	67.
2.c.6.b) Sobre-expresión del Receptor de Exportación Nuclear CRM1/Embargoed.	68.
i. <i>Efecto de la sobre-expresión de embargoed sobre la localización subcelular de Sima en el equilibrio.</i>	68.
ii. <i>Efecto de la sobre-expresión de Embargoed sobre la cinética de exportación de Sima.</i>	69.
2.d.) <b>Regulación por oxígeno de la exportación de Sima.</b>	70.
2.d.1) <i>Función de la hidroxilación de residuos de prolina en la localización subcelular de Sima.</i>	70.
2.d.2) <i>Función de la prolil hidroxilasa/fatiga en la localización subcelular de Sima.</i>	72.
2.d.2.a) Efectos de pérdida de función.	72.
2.d.2.b) Efecto de la sobre-expresión de <i>fatigaB</i> sobre la localización subcelular de Sima.	74.
2.d.3) <i>VHL es necesario para la regulación de la localización subcelular de Sima.</i>	76.
2.d.3.a) Efecto de pérdida de función de <i>VHL</i> sobre la localización subcelular de Sima.	76.

2.d.3.b) Efecto de la ganancia de función de <i>VHL</i> sobre la localización subcelular de Sima.	77.
2.d.3.c) <i>VHL</i> requiere de la hidroxilación de la prolina 850 para mediar la exportación de Sima.	79.
<i>2.d.4) La exportación nuclear de Sima mediada por embargoed requiere de la previa hidroxilación de la prolina 850.</i>	79.
<i>2.d.5) La actividad de VHL es necesaria para la exportación nuclear de Sima mediada por Embargoed.</i>	80.
<i>2.d.6) VHL regula la localización subcelular de Sima, también a través de un mecanismo independiente de Embargoed.</i>	82.
2.e.) Un efecto curioso: La sobre-expresión de FatigaA incrementa la localización nuclear de Sima.	84.
2.f.) Splicing Alternativo de Sima: Efecto de una isoforma truncada de Sima sobre la localización subcelular de la proteína completa.	86.
<b>V) DISCUSIÓN.</b>	88.
1. La degradación de Sima está mediada por la hidroxilación de un residuo de prolina.	89.
2. Sistema experimental para analizar la localización subcelular de Sima en embriones de <i>Drosophila</i> .	89.
3. La localización subcelular de Sima es el resultado de un equilibrio dinámico entre importación y exportación nuclear.	91.
4. La localización subcelular de Sima depende de parámetros del desarrollo.	92.
5. El equilibrio dinámico entre importación y exportación nuclear de Sima depende del sistema prolil hidroxilasa/ <i>VHL</i> .	93.
6. La exportación nuclear de Sima está regulada por el oxígeno.	93.
7. Otros mecanismos que regulan la localización subcelular de Sima.	94.
8. Compartimentalización y función de las prolil hidroxilasas.	95.
9. Ubiquitinación y la función dual de <i>VHL</i> .	97.
10. Relación entre degradación proteica y localización subcelular de HIF- $\alpha$ /Sima.	99.
<b>VI) APÉNDICES.</b>	100.
<b>VII) BIBLIOGRAFÍA.</b>	136.

# INTRODUCCIÓN

## **EL OXÍGENO COMO FUENTE DE ENERGÍA.**

La evolución hacia especies multicelulares complejas tuvo lugar gracias a la aparición de órganos especializados en captar activamente y transportar el oxígeno a todas las células del organismo. La oxigenación de las células en vertebrados terrestres es llevada a cabo por la función coordinada del sistema respiratorio y del circulatorio. Los pulmones presentan un rol activo en la ventilación de los alvéolos (unidad funcional del sistema respiratorio), los cuales están rodeados por un plexo denso de capilares sanguíneos. En la interfase del epitelio alveolar ocurre el intercambio gaseoso entre la sangre y el aire dentro del lumen pulmonar, de esta manera la hemoglobina presente en los glóbulos rojos libera el dióxido de carbono hacia el lumen pulmonar y capta el oxígeno. Luego, la hemoglobina, a través del sistema circulatorio, lleva el oxígeno con alta eficiencia a las células, tejidos y órganos del cuerpo.

Habitualmente, al hablar de respiración se hace referencia a la inhalación de aire, compuesto principalmente por nitrógeno y oxígeno, y a la exhalación de dióxido de carbono y vapor de agua, proceso que tiene lugar en los alvéolos pulmonares. Sin embargo, este intercambio es sólo la parte “visible” del proceso, ya que otra, menos evidente pero tan fundamental como aquélla, es la que ocurre dentro de las propias células eucariotas, razón por la que se la denomina **Respiración Celular**, y dado que ocurre en presencia de oxígeno también se la conoce como **Respiración Aeróbica**. Este tipo de respiración consiste en la oxidación de sustancias provenientes de nutrientes como los hidratos de carbono, grasas y, en menor proporción, las proteínas y la liberación de energía, dióxido de carbono y agua, permitiendo el aprovechamiento de la energía contenida en los nutrientes. Este proceso consta de tres etapas: **A) La glucólisis**, catabolismo de los azúcares para generar piruvato, **B) Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs)** y **C) Cadena Respiratoria o Fosforilación Oxidativa** del ADP a ATP, la cual consiste en la transferencia de electrones del NADH, NADPH o FADH, obtenidos en la glucólisis y en el ciclo de Krebs, al oxígeno molecular, lo que resulta en la generación de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial, que luego se utiliza para generar ATP. De esta manera, el oxígeno es el aceptor final de electrones de la respiración aeróbica. La naturaleza altamente oxidante del oxígeno lo convierte en un aceptor final de electrones ideal, ya que cuanto más oxidante sea el aceptor y más reductor sea el dador, más productivo energéticamente es el traspaso de electrones.

En ausencia de oxígeno la respiración aeróbica no tiene lugar y las células adoptan una forma menos eficiente de obtener energía conocida como **Fermentación Láctica**. Este proceso consiste en la transformación del piruvato generado por la glucólisis en ácido láctico, el cual es eliminado por las células al torrente sanguíneo. A pesar de que la fermentación es un proceso menos eficiente, permite a la célula continuar obteniendo energía de la glucólisis en ausencia de oxígeno sin afectar su estado redox.

Las células hipóxicas sensan disminuciones en el nivel de oxígeno y responden con un mecanismo auto-regulado de austeridad en el consumo de energía prescindiendo de funciones

celulares no esenciales (Hochachka et al., 1996). La hipoxia no solamente funciona como señal de conservación energética para la célula, sino que dirige además la expresión de un grupo selecto de genes que permiten adaptarse a la disminución en los niveles del oxígeno, entre los que se incluyen a isoformas específicas de enzimas glicolíticas y transportadores de glucosa que son funcionales a bajas concentraciones de oxígeno (Semenza et al., 1994). La respuesta a hipoxia existe en casi todos los seres vivos, desde organismos unicelulares como *Saccharomyces cerevisiae* hasta organismos pluricelulares complejos como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*.

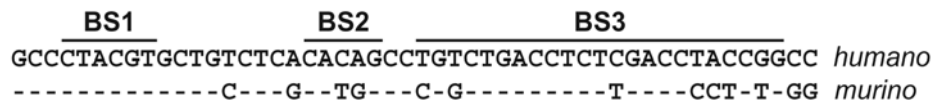
## **RESPUESTA A HIPOXIA EN LOS MAMÍFEROS.**

### **1. Inducción transcripcional en respuesta a hipoxia.**

Desde la década del '50 se sabía que la Eritropoyetina (**Epo**) era el principal regulador fisiológico de la disponibilidad de oxígeno en mamíferos. En organismos adultos esta hormona es sintetizada y secretada por el riñón, y funciona aumentando la producción y liberación de glóbulos rojos al sistema circulatorio (Erslev, 1953; Jacobson et al., 1957; Reissmann, 1950). Una vez clonado el gen que codifica para Epo (Jacobs et al., 1985; Lin et al., 1985), se encontró que su ARN mensajero está aumentado varias veces en el riñón de ratones en respuesta a anemia o hipoxia (Bondurant and Koury, 1986; Schuster et al., 1989). A partir de este resultado se demostró que la hipoxia tisular, ya sea provocada por cambios en la tensión de oxígeno atmosférico o por alteraciones de la capacidad de transporte y/o afinidad de la sangre al oxígeno, es el principal estímulo para la producción de Epo (Goldberg et al., 1988; Goldberg et al., 1989). Además, con el gen identificado sería posible estudiar la regulación transcripcional del gen *epo* por oxígeno. Este análisis fue realizado en una línea celular de hepatoblastoma humana (**Hep3B**), en la cual la tasa de transcripción del gen *epo* resultó aumentada más de 10 veces por incubación a 1% de oxígeno (Goldberg et al., 1991; Imagawa et al., 1991). A su vez, los autores observaron inducción del gen en presencia de metales divalentes como el cobalto (Co<sup>2+</sup>) o de Deferroxamina-B (**DFO**), un poderoso quelante de hierro producto metabólico del actinomiceto *Streptomyces pilosus*, (Wang and Semenza, 1993b).

Un estudio de la inducción por hipoxia del gen *epo*, tanto en ratones transgénicos como en células Hep3B, permitió identificar la presencia de *enhancers* sensibles a oxígeno en dicho gen (Beck et al., 1991; Blanchard et al., 1992; Caro et al., 1991; Semenza et al., 1991; Semenza and Wang, 1992). Estas secuencias de ADN resultaron capaces de dirigir la expresión de genes reporteros heterólogos, mostrando un aumento dramático de su expresión a 1% de oxígeno (Blanchard et al., 1992). En ese mismo año, se acotó esta región *enhancer* a 50 pares de bases localizadas en el extremo 3' flanqueante del gen *epo*, posicionado 116 nucleótidos río arriba del sitio de poli-adenilación (Semenza et al., 1991; Semenza and Wang, 1992). Análisis de hipersensibilidad a DNAsa I sobre

esta región demostró que dentro de estas 50 pares de bases hay al menos tres sitios diferentes de unión a factores de transcripción, responsable de la inducción de este gen (**Figura 1**) (Semenza and Wang, 1992). Estudios funcionales revelaron dos sitios absolutamente necesarios para la inducción transcripcional en respuesta a hipoxia: nucleótidos 4 al 12 corresponde al sitio **BS1** y nucleótidos 19 al 23 al **BS2**. Mutaciones en estos dos sitios evitan la inducción del reportero por hipoxia (Semenza and Wang, 1992). Si bien estos dos sitios son necesarios para la respuesta hipoxia, los autores determinaron (mediante ensayos de movilidad retardada en geles y de protección a DNAsa I) que el factor de transcripción inducible por hipoxia se une al sitio BS1 y que el sitio BS2 sería utilizado por un factor constitutivo necesario para el inicio de la transcripción. El sitio **BS3** corresponde a una región adicional, que no es necesaria para la respuesta hipoxia pero sí para la amplificación de la respuesta (Semenza and Wang, 1992). De esta manera, estos tres elementos definen un elemento de respuesta a hipoxia: **HRE** (“Hypoxic Response Element”) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Esquema del elemento de respuesta a hipoxia (HRE) del gen *eritropoyetina*.

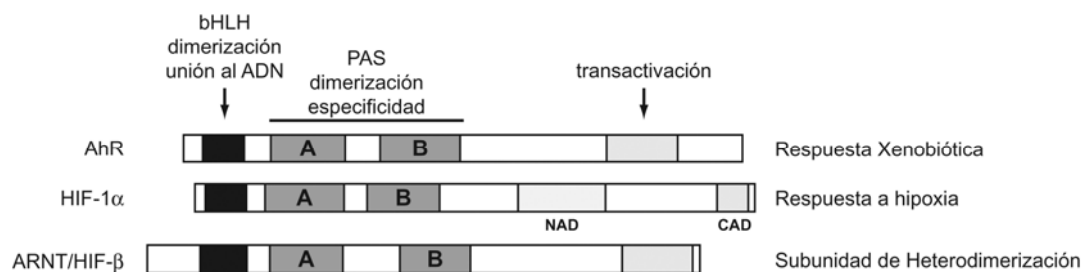
Secuencia del *enhancer* inducible por hipoxia del gen de la *eritropoyetina* humana, el cual está constituido por tres regiones: sitio de unión del factor inducible por hipoxia (**BS1**) y a otros factores de transcripción (**BS2 y BS3**). El sitio BS2 sería utilizado por un factor constitutivo necesario para el inicio de la transcripción, mientras que el BS3 no sería necesario para la respuesta hipoxia *per se* pero sí para la amplificación de la respuesta. Debajo, la secuencia homóloga del *enhancer epo* murino se indica con los residuos conservados marcados con guiones. Tomado de (Semenza and Wang, 1992).

## 2. Un factor de transcripción responsable de la inducción por hipoxia.

Una vez identificado el gen de la *epo*, se realizaron estudios con el propósito de identificar al Factor de Transcripción responsable de la inducción del gen por hipoxia. Este factor de unión a HRE fue purificado por cromatografía de afinidad a la secuencia *enhancer* de *epo*, el cual resultó ser un factor hetero-dimérico compuesto por una subunidad alfa de 120 kDa y una subunidad beta de 91-94 kDa (Wang and Semenza, 1995). Luego de secuenciar estas proteínas, los autores encontraron que la subunidad beta era idéntica a la proteína **ARNT** (“Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator”)(Wang et al., 1995a; Wang and Semenza, 1995), previamente caracterizada por ser el factor que hetero-dimeriza con el receptor **AhR** (“Aryl Hydrocarbon Receptor”) también conocido como receptor de dioxina (Hankinson, 1995). En cambio, la subunidad alfa resultó ser una nueva proteína de 826 aminoácidos, también perteneciente a la misma clase de proteínas que ARNT. Debido a que la actividad y abundancia de dicho factor de transcripción eran inducidas por hipoxia, al complejo hetero-dimérico se lo denominó **HIF-1** (“Hypoxia Inducible Factor 1”) (Wang

et al., 1995a; Wang and Semenza, 1993a; Wang and Semenza, 1993c; Wang and Semenza, 1995).

Las proteínas HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  pertenecen a la familia de proteínas **bHLH-PAS**, las cuales están formadas por un dominio básico (**b**) de unión al ADN seguido de un dominio hélice-vuelta-hélice (**HLH**) y un dominio llamado **PAS**, el cual contiene dos unidades de homología interna, PAS-A y PAS-B (**Figura 2**). El dominio bHLH media tanto la unión al ADN como la homo- o la hetero-dimerización. El dominio PAS está implicado en interacciones proteína-proteína y confiere la especificidad por los genes blanco (Huang et al., 1993; Lindebro et al., 1995). De esta manera, la mitad amino-terminal de HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  contiene a los dominios bHLH y PAS, requeridos para la unión al ADN y para la dimerización entre ambas subunidades. La región carboxi-terminal de cada subunidad es requerida para la función de activación transcripcional (Fukunaga et al., 1995; Jiang et al., 1996; Reisz-Porszasz et al., 1994) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Proteínas de la familia bHLH-PAS en mamíferos.

Se esquematizan los dominios conservados de los factores de transcripción de la familia bHLH-PAS: la secuencia básica (**b**) de unión al ADN, el motivo hélice-vuelta-hélice (**HLH**) de dimerización y el dominio PAS, formado por los subdominios PAS A y PAS B, de interacción proteína/proteína. Tanto el receptor de dioxigenina (**Ahr**) como HIF-1 $\alpha$  hetero-dimerizan con la subunidad común ARNT/HIF- $\beta$ . Hacia el extremo C-terminal, las proteínas de esta familia presentan en el extremo carboxilo-terminal el dominio de transactivación. En HIF-1 $\alpha$  se indica el dominio **NAD** responsable, junto al dominio **CAD** (dominio de transactivación), de la regulación por oxígeno de esta subunidad. Modificado a partir de (Kewley et al., 2004).

Estudios posteriores demostraron que la expresión de genes endógenos y de elementos reporteros mostró un comportamiento refractario a la hipoxia en células deficientes para HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  (Wood et al., 1996), confirmando la importancia de ambas subunidades para la funcionalidad del factor de transcripción.

### 3. Un factor de transcripción pleiotropico en cada célula.

Los estudios de inducción por hipoxia del *enhancer* del gen *epo* fueron realizados en las células Hep3B. Luego empleando un gen reportero construido con el *enhancer* del gen *epo*, se detectó actividad de HIF-1 en todos los tipos celulares en los que se probó, aún en aquéllos en los que la proteína Epo no se expresa (Huang et al., 1998; Maxwell et al., 1993a; Maxwell et al., 1993b). Estos resultados sugirieron la presencia de un mecanismo general de respuesta hipoxia, lo que motivó la



búsqueda de otros genes blanco de HIF. En la **Figura 3** se detallan otros genes inducibles por hipoxia, los cuales comparten con el gen *epo* una secuencia HRE típica en sus regiones regulatorias (Kimura et al., 2001).

Genes	HRE	Espacio (nt)
VEGF	5'- CATACGTGGGCTCCAACAGGTCCT -3'	8
EPO	5'- CCTACGTGCTGTCTCACAGCCT -3'	8
ENO-1	5'- CGCACGTGGCCCCGGACACGCAGC -3'	8
LDH-A	5'- CACACGTGGGTTCCCGCACGTCCG -3'	8
GLUT-1	5'- CAGGCGTGCCGTCTGACACGCATC -3'	8
HO-1	5'- CGGACGTGCTGGCGTGGCACGTCCT -3'	9
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div style="text-align: center;"> <hr style="width: 50px; margin: 0 auto;"/> <b>BS1</b> </div> <div style="text-align: center;"> <hr style="width: 50px; margin: 0 auto;"/> <b>BS2</b> </div> </div>	

**Figura 3.** Los HREs de los genes inducibles por hipoxia comparten una estructura en común.

El HRE está formado por tres elementos: **BS1** (en rojo) que corresponde al sitio de unión de HIF-1, **BS2** (en azul) y BS3 (no mostrado en la figura). Los elementos BS1 y BS2 constituyen una inversión imperfecta repetida, siendo el espacio entre que los separa típicamente de 8 nucleótidos, crucial para la actividad del *enhancer*. *factor de crecimiento endotelio-vascular*: **VEGF**, *eritropoyetina*: **EPO**, *enolasa 1*: **ENO-1**, *lactato deshidrogenasa-A*: **LDH-A**, *transportador de glucosa*: **GLUT-1** y *hemo oxigenasa 1*: **HO-1**. La secuencia consenso para el sitio de unión de HIF-1 corresponde a 5'-(T/C)ACGTG-3' y para el BS2 es la 5'-CACG(T/C)-3' o 5'-CACA(G/T)-3'. Tomado de (Kimura et al., 2001).

Si bien se conocían varios genes blanco de este factor de transcripción, experimentos de microarreglos en células que sobre-expresan constitutivamente HIF-1 $\alpha$  revelaron la existencia de muchos otros genes inducidos por HIF-1 (Wykoff et al., 2000). En la **Tabla 1** se listan algunos de los procesos que involucran la expresión génica regulada por oxígeno. Por lo tanto, HIF-1 presenta un rol como mediador de la respuesta adaptativa a hipoxia tanto en células individuales (inducción de enzimas glicolíticas como fuente alternativa de energía) como también en organismos completos (EPO y VEGF).

**Tabla 1.** Genes regulados por oxígeno y el proceso en el que están involucrados. Las flechas indican aumento (↑) o disminución (↓) de la expresión en hipoxia.

Proceso	Gen regulado por oxígeno	Regulación por hipoxia
Eritropoyesis	<i>eritropoyetina</i>	↑
Glucólisis	<i>lactato deshidrogenasa-A</i>	↑
	<i>fosfoglicerato kinasa-1</i>	↑
	<i>aldolasa A y C</i>	↑
	<i>fosofructo kinasa L y C</i>	↑
	<i>piruvato kinasa M</i>	↑
	<i>enolasa A</i>	↑
Gluconeogénesis	<i>fosfofenolpiruvato carboxi-kinasa</i>	↓
Transporte de glucosa	<i>transportador de glucosa 1</i>	↑
	<i>transportador de glucosa 2</i>	↑
	<i>transportador de glucosa 3</i>	↓
Síntesis de catecolaminas	<i>tirosina hidroxilasa</i>	↑
Transporte de hierro	<i>transferrina</i>	↑
Factores de crecimiento	<i>factor de crecimiento del endotelio vascular (vegf)</i>	↑
	<i>factor derivado de plaquetas (pdgf)</i>	↑
	<i>factor de crecimiento de la placenta</i>	↓
Síntesis de óxido nítrico	<i>óxido nítrico sintetasa inducible</i>	↑
	<i>óxido nítrico sintetasa endotelial</i>	↓
Vasomotores	<i>endotelina-1</i>	↑
Metabolismo de fosfatos	<i>adenilato kinasa-3</i>	↑
Metabolismo del hemo	<i>oxigenasa del hemo 1</i>	↑

#### 4. Diferentes subunidades alfa de HIF.

Luego de identificar a HIF-1 $\alpha$ , se describieron otros dos miembros de esta familia: HIF-2 $\alpha$  (o EPAS-1) (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Hogenesch et al., 1997; Tian et al., 1997) y HIF-3 $\alpha$  (Gu et al., 1998). A diferencia de la expresión ubicua de HIF-1 $\alpha$ , estos dos miembros de la familia mostraron un patrón de expresión tisular mucho más restringido.

La proteína HIF-2 $\alpha$  está formada por 874 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 97 kDa. Presenta una gran similitud con HIF-1 $\alpha$  en su estructura (Ema et al., 1997; Flamme et al., 1997; Hogenesch et al., 1997; Tian et al., 1997), así como en su regulación dependiente del oxígeno (Wiesener et al., 1998). Además, se demostró que HIF-2 $\alpha$  hetero-dimeriza con HIF-1 $\beta$ /ARNT, complejo que resultó ser funcional para la transactivación de genes reporteros de hipoxia (O'Rourke et al., 1999).

El gen *hif-3 $\alpha$*  codifica para una proteína de 662 aminoácidos con un peso molecular predicho de 73 kDa (Gu et al., 1998). En adultos HIF-3 $\alpha$  se expresa en el timo, pulmón, cerebro, corazón y riñón. La región N-terminal contiene el dominio bHLH-PAS característico, compartiendo un 55% de similitud con las otras dos proteínas de la familia HIF- $\alpha$ . Estudios tanto in vitro como in vivo revelaron que, al igual que otras subunidades- $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  hetero-dimeriza con HIF- $\beta$ /ARNT y el complejo resultante reconoce HREs (Gu et al., 1998). La actividad de HIF-3 $\alpha$  también está aumentada tanto en hipoxia como en presencia de cobalto (Gu et al., 1998).

La existencia de tres HIF- $\alpha$  cuya expresión está parcialmente solapada sugiere que sus funciones podrían ser redundantes. Si bien está demostrado que HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$  pueden interactuar con el sitio de unión al ADN (HRE) reconocido por HIF-1 $\alpha$ , no se conoce el rol preciso de cada uno de los miembros de esta familia HIF.

## **5. Regulación de HIF.**

Como se mencionó anteriormente, la abundancia y la actividad transcripcional de los complejos HIF se inducen por exposición de las células a hipoxia (1% de oxígeno), pero cuando las células son llevadas a normoxia (21% de oxígeno) la actividad funcional desaparece rápidamente (Huang et al., 1996). Los estudios iniciales se centraron en entender los mecanismos celulares que median la regulación de HIF-1 por oxígeno.

Debido a que HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico compuesto por dos subunidades, alfa (HIF-1 $\alpha$ ) y beta (ARNT/HIF-1 $\beta$ ), fue necesario evaluar el efecto del oxígeno sobre ambas subunidades. Se demostró que los niveles de ARNm de *hif-1 $\alpha$*  y *hif-1 $\beta$*  no varían significativamente en hipoxia respecto de normoxia, en cambio sí se encontró una diferencia a nivel proteico. La subunidad beta, que heterodimeriza además con otras proteínas de la familia bHLH-PAS (Jiang et al., 1996), se expresa constitutivamente (Gleadle and Ratcliffe, 1998; Huang et al., 1996). En cambio, se encontró que la subunidad alfa varía sus niveles proteicos en función del oxígeno: HIF-1 $\alpha$  se acumula en hipoxia, y cuando las células conteniendo altos niveles de esta subunidad son re-oxigenadas se observa una caída rápida en sus niveles proteicos (Huang et al., 1996). Estos resultados demostraron que la actividad transcripcional del complejo HIF-1 está regulada por algún mecanismo post-transcripcional que opera sobre la subunidad alfa, en función de los niveles del oxígeno. Actualmente se conocen cuatro mecanismos de regulación sobre HIF-1 $\alpha$  dependientes del oxígeno: a) Estabilidad proteica, b) Interacción con co-activadores transcripcionales, c) Localización subcelular y d) Co-expresión de formas dominantes negativas.

### **5.a) Estabilidad proteica de HIF-1 $\alpha$ .**

Se determinó, mediante ensayos de Western Blot, en células de mamíferos que HIF-1 $\alpha$  es virtualmente indetectable en normoxia, siendo la vida media extremadamente corta (aproximadamente 5 min.). Los niveles proteicos aumentan dramáticamente tras pocas horas de incubación en hipoxia, alargándose su vida media a más de 1 hora (Huang et al., 1998; Maxwell et al., 1999; Wang et al., 1995a). A causa de que HIF-1 $\alpha$  no mostraba cambios significativos en los niveles de ARN mensajero luego de la exposición a hipoxia (Wang et al., 1995a), se sospechaba que la regulación de la subunidad alfa por el oxígeno era post-transcripcional. Para ello, se realizaron experimentos de pulso y caza en presencia de ciclohexamina, droga que inhibe la traducción

proteica (Huang et al., 1996). Se encontró que la vida media de HIF-1 $\alpha$  es más larga en células expuestas a hipoxia, en comparación con su rápida desaparición cuando las células eran puestas nuevamente en normoxia. Este experimento sugirió que el modo primario de regulación de la subunidad alfa es a nivel post-traducciona, ocurriendo a través de cambios en su estabilidad proteica. Dado que la subunidad beta no está afectada por los niveles del oxígeno, el aumento en la cantidad de HIF-1 funcional en hipoxia se debe a la estabilización de la subunidad alfa (Bunn and Poyton, 1996; Gleadle and Ratcliffe, 1998).

Se realizaron estudios para definir si la degradación ocurría en lisosomas o en el proteasoma de 26S. Para ello, se utilizaron inhibidores específicos, y se encontró que solamente la inhibición del proteasoma de 26S (mediante lactacistina o MG-132) provocó la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en normoxia (Salceda and Caro, 1997). Más tarde, otros trabajos confirmaron que la degradación de la subunidad alfa ocurre efectivamente en el proteasoma de 26S pero sólo en presencia de oxígeno (Jiang et al., 1997; Lee et al., 2004; Pugh et al., 1997).

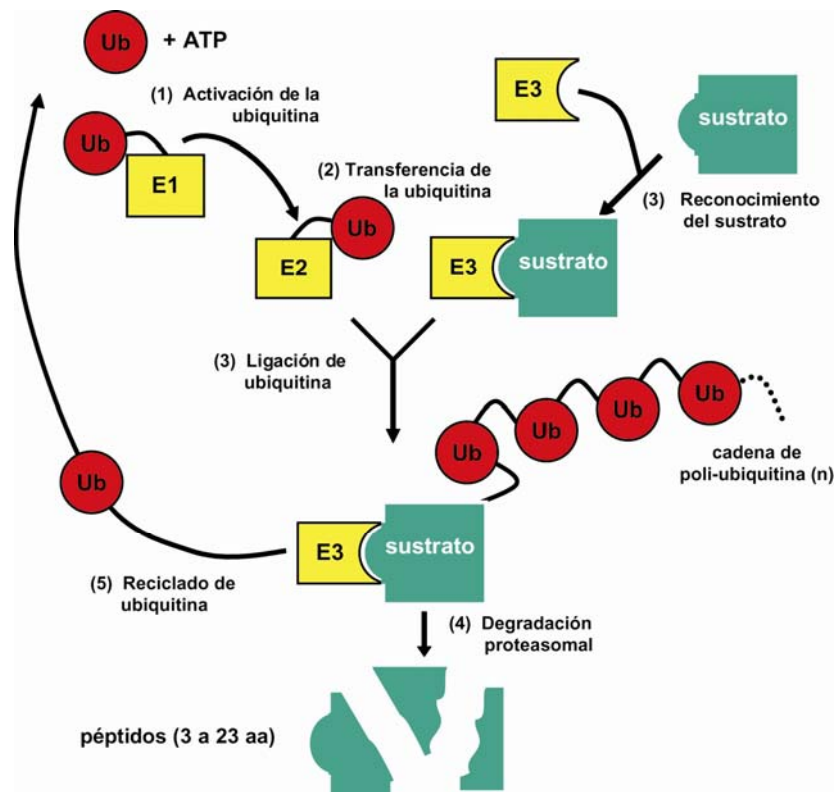
Antiguamente se pensaba que el proteasoma de 26S estaba encargado solamente de degradar proteínas defectuosas o mal plegadas; sin embargo, ahora se sabe que el proteasoma juega un rol central en muchos procesos celulares, constituyendo un mecanismo preciso de control de la vida media de proteínas clave, cuyos niveles son críticos para la fisiología celular.

### ***5.a.1) El sistema Ubiquitina-Proteasoma.***

#### **5.a.1.1) Ubiquitina.**

Generalmente, las proteínas destinadas a la degradación en el proteasoma de 26S están covalentemente unidas a un polipéptido pequeño formado por 76 aminoácidos denominado **Ubiquitina** (Ciechanover et al., 1980; Hershko et al., 1980). Su nombre hace referencia a su distribución ubicua en todas las células y al alto grado de conservación en los organismos eucariotas (Goldstein et al., 1975; Schlesinger et al., 1975). Luego, se encontró que era necesaria la unión de varias moléculas de ubiquitina, formando una cadena, para que la proteína blanco sea reconocida y degradada por el proteasoma 26S (Ciechanover et al., 1980; Hershko et al., 1980).

La unión covalente entre la ubiquitina y la proteína blanco, conocida como ubiquitinación, es un proceso altamente regulado y específico que involucra la actividad secuencial de tres enzimas: una enzima activadora de ubiquitina (**E1**), una enzima conjugadora de ubiquitina (**E2**) y una proteína que cataliza la transferencia final de la ubiquitina al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina del sustrato (**E3**, ubiquitin-protein ligase) (Ciechanover et al., 1981; Hershko et al., 1983) (**Figura 4**).



**Figura 4.** Poli-ubiquitinación y degradación específica del sustrato en el proteasoma 26S.

La conjugación de la ubiquitina (Ub) al sustrato depende de una cascada de tres eventos: (1) Activación de la ubiquitina por la enzima E1, en una reacción dependiente de ATP; (2) La ubiquitina activada es transferida al sitio activo de la enzima E2 y (3) La enzima E3 reconoce específicamente al sustrato y cataliza la unión covalente de la ubiquitina activada desde la enzima E2 a un grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de un residuo lisina del sustrato. Las E3 funcionan como andamio estructural, posicionando a la enzima E2 y al sustrato de manera de optimizar la transferencia directa al sustrato. (4) La adición sucesiva de formas activadas de ubiquitina genera la cadena de poli-ubiquitina, la cual es reconocida por el proteasoma de 26S, llevando a la degradación proteolítica del sustrato ubiquitinado. (5) La molécula de ubiquitina es reciclada. Modificado a partir de (Glickman and Ciechanover, 2002).

Las enzimas E3 son las que otorgan exquisita especificidad al sistema, ya que se unen específicamente a las enzimas E2 y además reconocen señales en las proteínas blanco, reclutándolas en forma selectiva a la maquinaria de ubiquitinación (Patton et al., 1998). La reiteración de este proceso sobre un mismo sustrato, genera una cadena de poli-ubiquitinas que marca a dicha proteína para su degradación en el proteasoma de 26S (Pickart, 2000; Piotrowski et al., 1997) (Figura 4). Contrariamente, la unión de una sola molécula de ubiquitina al sustrato regula una variedad de procesos celulares que no involucran degradación proteasomal. Ejemplos de ello son el requerimiento de ubiquitina para la endocitosis de receptores y proteínas de membrana (Shih et al.,

2000; Strous and Govers, 1999), para la reparación post-replicativa del ADN (Spence et al., 1995) y para cambios en la localización subcelular de factores de transcripción (Yu et al., 2000), entre otros.

En la mayoría de los organismos existe una única enzima E1, un número acotado pero significativo de enzimas E2 y una amplia variedad de E3 ligasas.

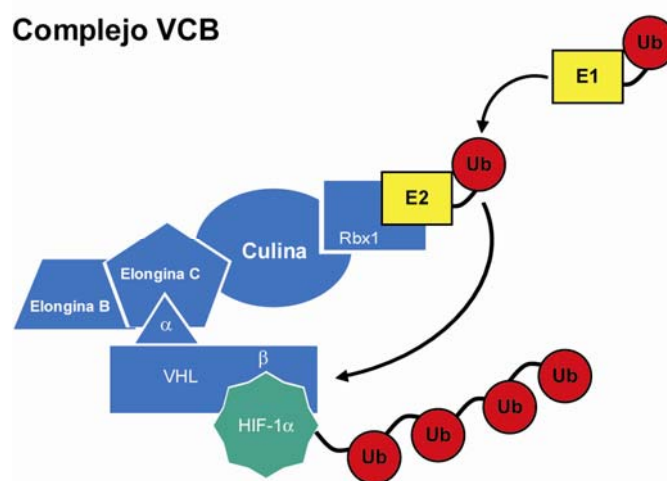
#### 5.a.1.2) La ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$ depende del gen supresor de tumores de von Hippel-Lindau.

En el año 1998 estudios realizados por Huang y colaboradores demostraron que la degradación proteasomal de HIF-1 $\alpha$  requiere la conjugación de ubiquitina al sustrato (Huang et al., 1998). Los autores transfectaron células 293 con vectores expresando HIF-1 $\alpha$  y ubiquitina fusionada a hemaglutinina (HA-ubiquitina) en presencia de un inhibidor específico del proteasoma y encontraron una especie de HIF-1 $\alpha$  altamente ubiquitinada en estas células. Experimentos complementarios demostraron que la subunidad alfa se encontraba ubiquitinada en cultivos crecidos en normoxia, pero no en cultivos crecidos en hipoxia (Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999). Sin embargo, quedaba por identificar a la proteína E3 responsable del reconocimiento específico y de la ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  en presencia de oxígeno.

Maxwell y colaboradores (1999) esclarecieron este punto, al encontrar que la proteína supresora de tumores **VHL** (“von Hippel-Lindau”) estaba involucrada en el reconocimiento de HIF-1 $\alpha$  en normoxia, provocando su poli-ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma de 26S (Maxwell et al., 1999). Estos autores reportaron la expresión constitutiva de genes blanco de HIF-1 en líneas celulares de carcinoma renal (RCC4 y 786-O) deficientes en VHL (*vhl*<sup>-/-</sup>), lo cual correlacionaba con la acumulación constitutiva del complejo HIF-1 en normoxia (Maxwell et al., 1999). Los niveles de ARN mensajero de *hif-1 $\alpha$*  y *hif-1 $\alpha\beta$*  eran normales en estas células, mientras que HIF-1 $\alpha$  mostró una vida media muy incrementada (60 minutos en lugar de 5 min. en células WT) en normoxia (Maxwell et al., 1999; Ohh and Kaelin, 1999). Finalmente, pudo demostrarse la interacción física entre HIF-1 $\alpha$  y VHL en células crecidas en normoxia mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (Maxwell et al., 1999); dicha interacción no ocurría cuando las células se incubaban en hipoxia (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Estos resultados demostraron que la proteína VHL regula la actividad transcripcional de HIF-1, controlando la vida media de la subunidad alfa.

La herencia de un alelo mutante de *VHL* (mutación autosómica dominante) lleva a la enfermedad de von Hippel-Lindau (Kaelin and Maher, 1998), la cual predispone a los individuos afectados a una variedad de tipos de cáncer hereditarios. Los tumores de los pacientes VHL son típicamente muy vascularizados a causa de la producción excesiva de péptidos angiogénicos (como VEGF) por parte de las células tumorales, debido al incremento en la actividad transcripcional constitutiva de HIF-1 (Sato et al., 1994; Wizigmann-Voos et al., 1995).

Se encontró que la proteína VHL interactúa además con las proteínas Elonguina B y Elonguina C (Kibel et al., 1995), Culina 2 (**Cul-2**) (Ohh and Kaelin, 1999) y Rbx1 (Kamura et al., 1999). Debido a que estas interacciones eran necesarias para que VHL pueda regular la inducción de genes de respuesta a hipoxia (Gnarra et al., 1996; Iliopoulos et al., 1996; Lisztwan et al., 1999), se postuló que las proteínas interactuantes debían formar un complejo pentamérico, responsable de la poliubiquitinación de HIF-1 $\alpha$ . Este complejo fue denominado **VCB** (compuesto por VHL, Elonguinas-BC, Rbx1 y Cul2) (**Figura 5**), donde la proteína VHL funciona como la subunidad de reconocimiento de HIF-1 $\alpha$  (Cockman et al., 2000; Iwai et al., 1999; Lisztwan et al., 1999; Pause et al., 1999).



**Figura 5.** Complejo VCB ubiquitina ligasa.

Se muestra la estructura y composición del complejo E3 ubiquitina-ligasa VCB. La enzima **E1** transfiere a la ubiquitina (**Ub**) a la enzima conjugadora de ubiquitina **E2**, la cual interactúa con el complejo E3 ubiquitina-ligasa **VCB** (Elongina-B, Elongina-C, Culina 2, VHL y Rbx1) catalizando la transferencia de la ubiquitina al sustrato. La especificidad de la enzima E3 por el sustrato está dada por la proteína VHL, la cual interactúa con el complejo a través de su dominio alfa y reconoce específicamente a HIF-1 $\alpha$  a través de su dominio beta. Figura adaptada de Wappner y Ratcliffe, *Genetic Models in Cardiorespiratory Biology* 2001, 156.

### 5.a.2) Dominio de degradación dependiente de oxígeno de HIF-1 $\alpha$ .

Para definir qué porciones de HIF-1 $\alpha$  son responsables de la degradación dependiente de oxígeno se llevaron a cabo estudios de estructura-función sobre HIF-1 $\alpha$ , donde distintas secuencias aminoacídicas fueron fusionadas al dominio de unión al ADN del factor de transcripción de levaduras Gal4 (Huang et al., 1998; Jiang et al., 1997; Pugh et al., 1997). Los autores analizaron la actividad transcripcional de estas quimeras en función de los niveles del oxígeno, utilizando un gen reportero de la actividad de Gal4. Estos experimentos les permitió encontrar dos dominios regulatorios dependientes del oxígeno en HIF-1 $\alpha$ : uno adyacente al dominio de transactivación en

la región C-terminal (**CAD**) y el otro localizado en la región central de la proteína, que se lo llamó **NAD**, dada su proximidad con el extremo N-terminal (**Figura 2**). Un análisis de la secuencia mínima necesaria para la regulación por oxígeno permitió ubicar al dominio NAD entre los residuos 549 y 582, y al CAD entre los aminoácidos 775 y 826 (Ema et al., 1999; Huang et al., 1998; Jiang et al., 1997; Pugh et al., 1997).

Sin embargo, análisis por Western blot de estas quimeras indicaron que la regulación mediada por el oxígeno sobre los dominios NAD y CAD ocurre a través de mecanismos distintos (Ema et al., 1999; Pugh et al., 1997). La regulación por el oxígeno del dominio CAD altera la actividad transcripcional de la quimera con GAL4 sin modificar niveles de proteína (la función regulatoria de este dominio será explicada más adelante). En cambio, el dominio NAD regula la estabilidad proteica de la quimera con Gal4 de manera diferencial en hipoxia con respecto a normoxia, sugiriendo que la regulación por oxígeno de este dominio ocurre a nivel de su degradación en el proteasoma. Al remover el dominio NAD, HIF-1 $\alpha$  pierde su regulación por oxígeno, siendo estable tanto en normoxia como en hipoxia (Huang et al., 1998; Pugh et al., 1997). Esta región se denominó, por sus características particulares, dominio de degradación dependiente de oxígeno (**ODDD**, por “**O**xxygen **D**ependent **D**egradation **D**omain”) (Huang et al., 1998). La sobre-expresión en la epidermis de ratones transgénicos de una forma de HIF-1 $\alpha$  a la que se le delecionó el ODDD provocó un aumento en el número de capilares sanguíneos debido a un gran aumento en la expresión de VEGF (Elson et al., 2001). Más tarde, se encontró que el ODDD era esencial para la interacción física entre HIF-1 $\alpha$  y VHL y además, que dicha interacción era dependiente de oxígeno y de hierro (Huang et al., 1998; Tanimoto et al., 2000).

Quedaba todavía por definir por qué motivo HIF-1 $\alpha$  era reconocido por VHL únicamente en normoxia y no en hipoxia.

### **5.a.3) Un sensor molecular de oxígeno que regula la estabilidad de HIF- $\alpha$ .**

Un dato curioso de la interacción entre VHL y HIF-1 $\alpha$  era que si ambas proteínas se expresaban en *E. coli* ó en lisados de germen de trigo, dicha interacción no tenía lugar. En cambio, si HIF-1 $\alpha$  recombinante se incubaba previamente con extractos celulares humanos, de ratón o de *Xenopus*, la interacción con VHL se restituía (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001), sugiriendo que factores presentes en dichos lisados eran capaces de modificar a HIF-1 $\alpha$  regulando su interacción con VHL (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001).

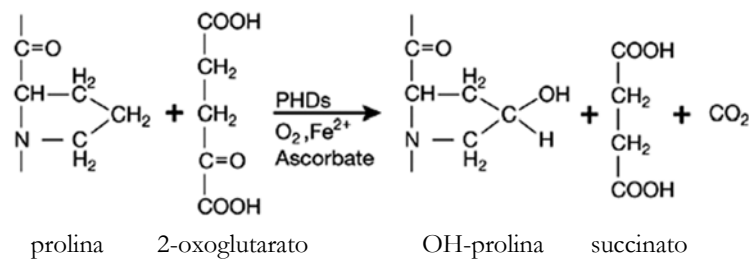
Análisis por espectroscopía de masa de péptidos sintéticos del ODDD de HIF-1 $\alpha$ , en comparación con péptidos pre-tratados con extractos de células de mamíferos, mostraron la existencia de modificaciones post-traduccionales en los péptidos pre-tratados (Jaakkola et al., 2001). Dicha modificación post-traducciona fue identificada como la hidroxilación de un residuo de prolina dentro del ODDD. Se realizaron diferentes mutaciones en los residuos de prolina existentes



en el ODDD y se encontró que la sustitución de la prolina 564 de HIF-1 $\alpha$  evitaba la interacción con VHL (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). De acuerdo con esto, un péptido sintético conteniendo un residuo hidroxiprolina en la posición 564 bloqueó la interacción entre HIF-1 $\alpha$  y VHL, sin requerir de un tratamiento previo con extractos celulares (Jaakkola et al., 2001). Posteriormente, se encontró que la hidroxilación de un segundo residuo prolina en la posición 402, es también importante para el reconocimiento de HIF-1 $\alpha$  por parte de VHL (Masson et al., 2001). En función de los aminoácidos flanqueantes a estos dos residuos de prolina se definió la secuencia LXXLAP como la necesaria para la interacción con VHL, estando esta secuencia conservada en la evolución (Masson et al., 2001). Estos resultados demostraron inequívocamente que la modificación post-traducciona dependiente de oxígeno de HIF-1 $\alpha$  en normoxia consiste en una hidroxilación de los residuos de prolina 402 y 564 presentes en el dominio ODDD.

Las únicas enzimas con actividad prolil hidroxilasa (**PH**) previamente caracterizadas en mamíferos eran las que catalizan la hidroxilación de residuos de prolina de la molécula de procolágeno, lo cual ocurre a lo largo de la vía secretoria. Las PHs involucradas en este proceso pertenecen a la superfamilia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato. Sin embargo, existían evidencias para suponer que las PHs modificadoras de HIF-1 $\alpha$  eran diferentes de las PHs del colágeno (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Yu et al., 2001).

Un screen llevado a cabo en *Caenorhabditis elegans* permitió finalmente identificar al producto del gen *egl-9*, como la prolil hidroxilasa que modifica a HIF-1 $\alpha$  en esta especie (Epstein et al., 2001). Mutantes de *C. elegans* para *egl-9* mostraron altos niveles del homólogo de HIF-1 $\alpha$  (CeHIF-1 $\alpha$ ) en normoxia. Finalmente, se demostró que la proteína recombinante EGL-9 promovía la hidroxilación de CeHIF-1 $\alpha$  en forma dependiente de 2-oxoglutarato, hierro y oxígeno, permitiendo la interacción con CeVHL. Una vez identificada la prolil hidroxilasa responsable de la estabilidad proteica de CeHIF-1 $\alpha$ , se realizaron estudios estructurales con el propósito de definir detalladamente la reacción que catalizan. De acuerdo con lo predicho, estas dioxigenasas utilizan 2-oxoglutarato y oxígeno molecular como co-sustratos, y presentan un centro de coordinación de átomos de hierro no-hémico, lo que concuerda con el absoluto requerimiento de Fe(II) como cofactor (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001, Mole, 2003 #144). Como producto de la reacción de hidroxilación se genera una prolina hidroxilada, succinato, agua y CO<sub>2</sub> (Schofield and Zhang, 1999) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Función catalítica de las prolil hidroxilasas.

Estas enzimas utilizan 2-oxoglutarato y oxígeno como sustratos, y  $\text{Fe}^{2+}$  y ascorbato como co-factores en la reacción que catalizan. Durante el curso de la reacción la enzima transfiere un átomo de oxígeno al residuo de prolina y el segundo átomo reacciona con el 2-oxoglutarato para generar succinato y dióxido de carbono. Tomado de (Berra et al., 2006).

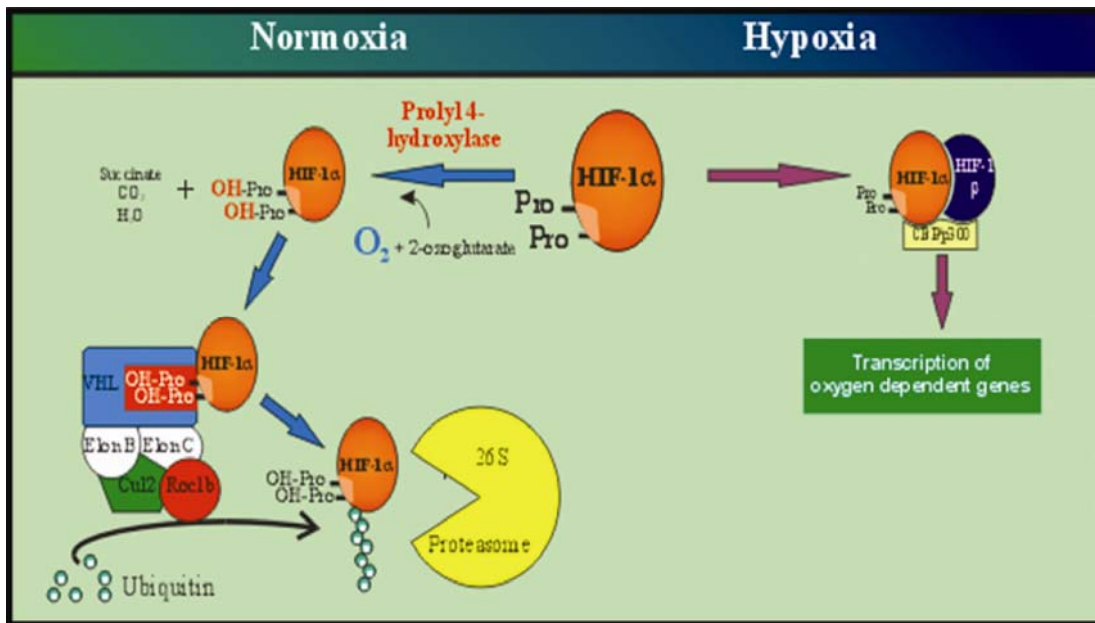
A partir de estos resultados, se pudieron identificar tres prolil hidroxilasas específicas para HIF-1 $\alpha$  en humanos, las cuales fueron designadas como **PHD** (“Prolyl Hydroxylase Domain containing”) 1, 2 y 3 (Epstein et al., 2001), las cuales son codificadas por genes diferentes. A pesar de que las tres isoformas resultaron activas sobre HIF- $\alpha$ , hidroxilando a la prolina crítica reconocida por VHL (Mole et al., 2003), la actividad catalítica de las tres isoformas es muy distinta, dependiendo de la subunidad alfa analizada (Appelhoff et al., 2004). Se encontró que PHD2 tendría un efecto mayor sobre HIF-1 $\alpha$  mientras que PHD1 y PHD3 lo tendrían sobre HIF-2 $\alpha$ , sugiriendo que las PHDs podrían tener funciones no redundantes. Además, los dos residuos de prolina dentro de HIF-1 $\alpha$  son diferencialmente hidroxilados por las PHDs: las tres enzimas pueden hidroxilar a la prolina 564, pero solamente PHD1 y PHD2 lo hacen sobre la prolina 402 (Chan et al., 2005; Epstein et al., 2001).

Las PHDs contienen en el extremo C-terminal el dominio catalítico, región común entre las enzimas. Sin embargo, las PHDs presentan una diferencia en la porción N-terminal: PHD2 tiene un dominio proteico adicional denominado **MYND**, que debe su nombre a las primeras proteínas en las que este dominio fue identificado: Myeloid translocation protein 8, Nervy, y DEAF1. El dominio MYND, involucrado en interacciones proteína-proteína, se encontró en proteínas que se unen a factores de transcripción, reprimiendo su actividad transcripcional. Un ejemplo de esto lo constituye la proteína BS69, la cual reprime la actividad transcripcional de varios factores de transcripción, como las proteínas E1A, EBNA2 (“Epstein-Barr virus oncoprotein”) y MGA (“Myc-related cellular protein”) (Ansieau and Leutz, 2002). En cada organismo donde se describió actividad prolil hidroxilasa sobre HIF- $\alpha$ , se encontraron varias isoformas de estas enzimas y al menos una de las isoformas de PHD estaba siempre presente el dominio MYND.

Puesto que la subunidad HIF-1 $\alpha$  no sufre hidroxilación en las prolinas clave dentro del ODDD a bajas concentraciones de oxígeno (Epstein et al., 2001; Jewell et al., 2001), las PHDs han sido consideradas como los *Sensores Moleculares* de oxígeno dentro de la célula. Dado que todas las

células expresan HIF-1 y VHL, y que la expresión de las prolin hidroxilasas también resultó ser ubicua, todas las células son capaces de promover una respuesta adaptativa a bajos niveles de oxígeno.

En la **Figura 7** se resumen las proteínas involucradas y todos los pasos requeridos para la regulación dependiente del oxígeno de la estabilidad proteica de HIF-1 $\alpha$ .



**Figura 7.** Regulación de la estabilidad proteica de HIF-1 $\alpha$  por el oxígeno.

En normoxia HIF-1 $\alpha$  sufre poli-ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma de 26, mientras que en hipoxia esta proteólisis no tiene lugar. En normoxia dos residuos de prolina dentro del ODDD son hidroxilados, en una reacción catalizada por dioxigenasas que requieren 2-oxoglutarato y oxígeno molecular como co-sustratos. La hidroxilación HIF-1 $\alpha$  permite la interacción con la proteína VHL, subunidad de reconocimiento del complejo ubiquitina E3 ligasa VCB (VHL; Cullina 2; Rbx1 y Elonginas B y C), el cual media la poli-ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$ . A bajos niveles de oxígeno la hidroxilación de las prolinas no tiene lugar, impidiendo la interacción con VHL y su posterior ubiquitinación. Luego, la formación del complejo HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  promueve la transcripción dependiente de oxígeno de genes blanco.

## 5.b) Reclutamiento de co-activadores.

### 5.b.1) Un dominio de activación transcripcional en la región carboxil-terminal de HIF-1 $\alpha$ .

El dominio ODDD (NAD) es el responsable de la estabilidad diferencial de HIF-1 $\alpha$ . Sin embargo, al evitar la degradación de la proteína en normoxia no se observó la activación completa de HIF-1, indicando que la mera estabilización de la proteína no es suficiente (Kallio et al., 1999; Salceda and Caro, 1997). La delección de una porción C-terminal de HIF-1 $\alpha$  no afecta su dimerización con HIF-1 $\beta$  ni la unión al ADN, pero se observa una disminución en la transactivación de genes reporteros (Jiang et al., 1996). Estos resultados sugieren que la actividad

transcripcional de HIF-1 $\alpha$  está controlada de alguna manera a través de su porción carboxilo-terminal.

Como se señaló anteriormente (punto 5.a.2) se realizaron estudios de estructura-función sobre HIF-1 $\alpha$ , en los que se fusionaron distintas regiones de la proteína al dominio de unión al ADN del factor de transcripción Gal4 (Huang et al., 1998; Jiang et al., 1997; Pugh et al., 1997). Estas proteínas de fusión fueron co-transfectadas junto a un plásmido reportero de la función de Gal4, con el propósito de identificar a los aminoácidos involucrados en la regulación de la actividad transcripcional. Este experimento permitió definir la existencia de un dominio de transactivación **CAD**, que mapea entre los aminoácidos 786 y 826 de HIF-1 $\alpha$  (**Figura 3**).

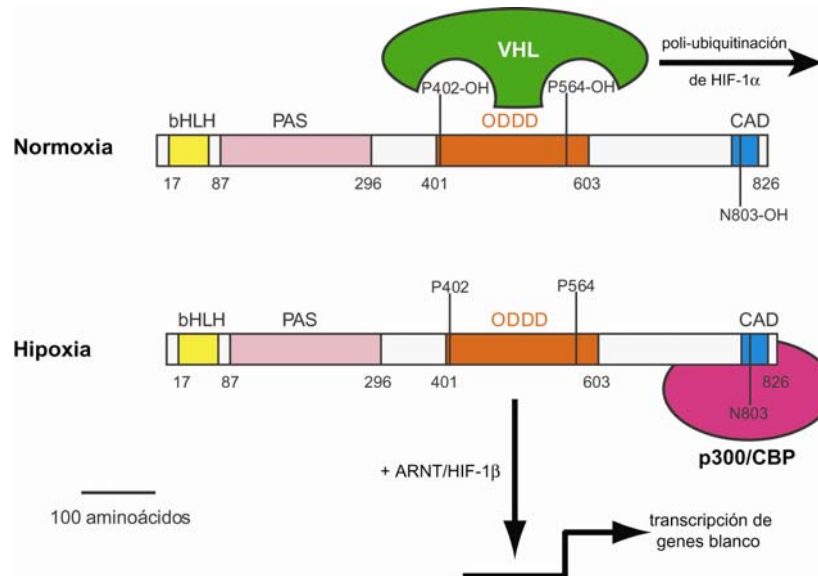
### **5.b.2) Co-activadores transcripcionales de HIF-1 $\alpha$ .**

En 1996, a partir de experimentos de movilidad retardada en geles se encontró que la proteína **p300** formaba parte del complejo HIF-1/ADN (Arany et al., 1996). La transfección de p300 en células estimulaba la transcripción a partir del *enhancer* del gen *epo* en respuesta a hipoxia (Arany et al., 1996). Más tarde, pudo demostrarse que el co-activador transcripcional p300 interactúa con el dominio CAD de HIF-1 $\alpha$ . Dicha interacción, al igual que la actividad transcripcional, resultó estar modulada por oxígeno, constituyendo un segundo mecanismo de control de HIF (Ema et al., 1999; Gu et al., 2001).

### **5.b.3) Un segundo sistema de sensado de oxígeno.**

Análisis por espectroscopia de masa de un péptido conteniendo el dominio CAD reveló la existencia de una modificación oxidativa (hidroxilación) sobre el residuo de asparagina 803 (Lando et al., 2002b). Más tarde, se demostró que esta hidroxilación está catalizada por una proteína de la familia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, oxígeno y hierro (Hewitson et al., 2002), diferente a las PHDs que actúan sobre el ODDD. A esta nueva hidroxilasa se la conoce como **FIH** (“Factor Inhibiting HIF”) (Lando et al., 2002a). La inhibición de la actividad transcripcional de la subunidad HIF-1 $\alpha$  por parte de FIH en normoxia se demostró en ensayos de ARN de interferencia contra dicha enzima, en los cuales niveles disminuidos de FIH generaron un aumento en la transactivación de HIF-1 (Mahon et al., 2001). La reacción catalizada por FIH sobre la asparagina 803 es bioquímicamente análoga a la catalizada por las PHDs sobre las prolinas del ODDD (**Figura 6**).

La hidroxilación en la asparagina 803 dentro del CAD de HIF-1 $\alpha$  por parte de FIH evita la interacción física con p300, la cual es requerida para la máxima actividad transcripcional de HIF-1 (**Figura 8**). En hipoxia esta hidroxilación de la asparagina de HIF-1 $\alpha$  no tiene lugar, permitiendo la interacción con p300. De esta manera, la regulación dependiente del oxígeno por FIH sobre la asparagina 803 brinda una explicación mecánica al hecho de que la estabilización de HIF-1 $\alpha$  no resulta suficiente para su completa activación transcripcional en normoxia (Hofer et al., 2001).



**Figura 8.** Regulación de la estabilidad y la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  por el oxígeno.

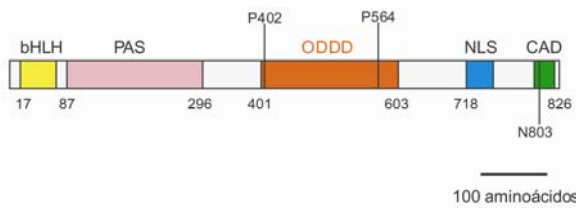
En normoxia, la hidroxilación de las prolinas 402 y 564 dentro del ODDD de HIF-1 $\alpha$  permite su interacción con VHL, lo que provoca la ubiquitinación y degradación de HIF-1 $\alpha$  en el proteasoma de 26S. Además, la hidroxilación de la asparagina 803 dentro del dominio CAD inhibe la interacción de HIF-1 $\alpha$  con el co-activador transcripcional p300/CBP. En hipoxia la hidroxilación de prolinas y de la asparagina no tienen lugar, lo que estabiliza a HIF-1 $\alpha$  y permite el reclutamiento del co-activador transcripcional p300/CBP.

### 5.c) Localización subcelular de HIF-1 $\alpha$ .

En normoxia, los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  son bajos y por lo tanto, su localización subcelular no puede ser observada. Para superar este inconveniente Kallio y colaboradores (1998) utilizaron al promotor de citomegalovirus para sobre-expresar HIF-1 $\alpha$  en células, superando la tasa de su degradación. Este sistema de sobre-expresión generó altos niveles de la proteína en normoxia permitiendo su visualización (Kallio et al., 1998). De esta manera, se encontró que HIF-1 $\alpha$  se encuentra acumulado en el citoplasma en normoxia, y en hipoxia está enriquecido en el núcleo (Kallio et al., 1998).

Proteínas de una masa mayor que 45 kDa requieren de una secuencia de localización nuclear, NLS (“Nuclear Localization Signal”), para poder ser importadas al núcleo (Dingwall and Laskey, 1991; Jans and Hubner, 1996). En HIF-1 $\alpha$  existen dos señales de localización nuclear predichas: una ubicada en la región N-terminal dentro del motivo bHLH, que en el contexto de la proteína completa no es funcional, presuntamente por encontrarse oculta por el dominio PAS (Kallio et al., 1998) y la segunda está ubicada en la región C-terminal (aas 718 al 722), siendo ésta la señal de localización nuclear funcional en HIF-1 $\alpha$  (Luo and Shibuya, 2001, Kallio, 1998 #26) (**Figura 9**). Si bien, se sabe que la importación nuclear depende de esta señal de localización nuclear presente en la región carboxilo terminal de HIF-1 $\alpha$  (Kallio et al., 1998; Luo and Shibuya, 2001), el mecanismo que

controla la localización subcelular dependiente de oxígeno aún no se conoce (Berra et al., 2001).



**Figura 9.** Representación esquemática de la proteína HIF-1 $\alpha$ .

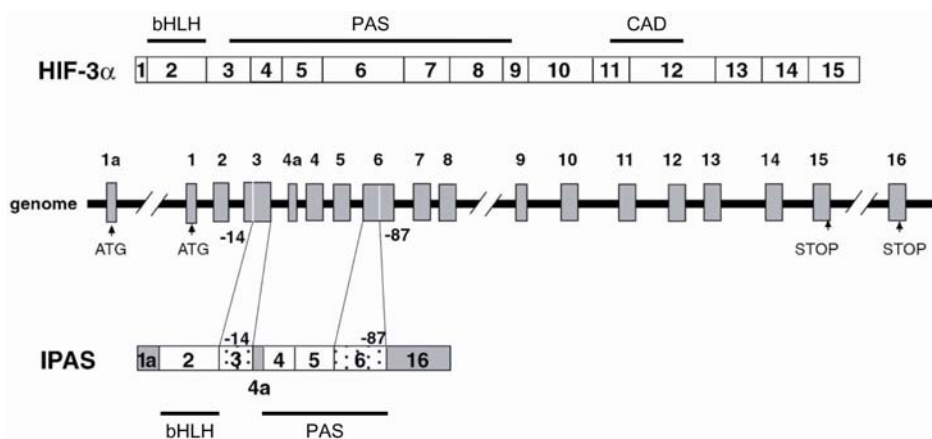
Esta proteína pertenece a la familia de factores de transcripción bHLH-PAS. Los dominios relevantes están indicados: la secuencia básica (b) de unión al ADN y el motivo de interacción

proteína-proteína (HLH) están marcados en amarillo; un segundo dominio de interacción proteína-proteína llamado PAS se señala en rosado; el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) en rojo incluye a las prolinas que se hidroxilan en normoxia; la señal de localización nuclear (NLS) está marcada en azul y en el dominio de transactivación (CAD), en verde, se indica la asparagina sujeta a hidroxilación en normoxia.

#### 5.d) Isoformas dominante negativas de HIF.

El mecanismo de respuesta a hipoxia opera en todos los tipos celulares de un organismo, a excepción de la cornea, donde la angiogénesis dependiente de HIF se encuentra inhibida a pesar de la hipoxia fisiológica que existe en este tejido.

A partir de un screening de secuencias en ratones se encontró una nueva proteína denominada IPAS (“Inhibitory PAS”), que contiene el motivo bHLH-PAS de HIF, pero carece del dominio ODDD y demás dominios hacia el C-terminal (Makino et al., 2001). Esta proteína está expresada predominantemente en las células de Purkinje del cerebelo y en la cornea del ojo en ratones (Makino et al., 2001). Un análisis más detallado reveló que IPAS es una variante de splicing del gen *HIF-3 $\alpha$* , la cual presenta tanto exones propios como compartidos con la proteína HIF-3 $\alpha$  e interesantemente, se induce por hipoxia (Figura 10) (Makino et al., 2002).



**Figura 10.** Splicing alternativo del gen *hif-3 $\alpha$* .

Los exones 1a, 4a y 16 son específicos del ARN mensajero de la proteína IPAS, el cual también está generado por porciones específicas de los exones 3 y 6. En el esquema se indican los dominios básicos hélice-vuelta-hélice (bHLH), PAS y el de transactivación. Tomado de (Makino et al., 2002).

La proteína IPAS contiene un marco de lectura abierto de 921 nucleótidos que codifican para un polipéptido de 307 aminoácidos. Esta variante de splicing funciona como dominante negativo

de HIF, inhibiendo la transcripción de genes blanco, merced a la formación de complejos improductivos con la proteína HIF-1 $\alpha$  en el núcleo, lo que evita la unión del complejo de transcripción a los HREs (Makino et al., 2001). El descubrimiento de IPAS definió un nuevo mecanismo de regulación de la expresión de genes dependientes de oxígeno que explica la supresión de la angiogénesis (fenotipo avascular) en la cornea.

#### **5.e) Otros mecanismos de regulación de la actividad de HIF.**

A pesar de que la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$  en las prolinas 402 y 564, dentro del ODDD, así como de la asparagina 503, dentro del CAD, son los eventos más importantes en el control de esta subunidad; la regulación del complejo HIF incluye otros mecanismos.

En tal sentido, se demostró que HIF-1 $\alpha$  puede ser fosforilado, incrementando su actividad transcripcional (Salceda et al., 1997; Wang et al., 1995b; Wang et al., 1995c). Varios reportes mostraron que la fosforilación está mediada por **MAPK** (“**Mitogen Activated Protein Kinase**”) (Hur et al., 2001; Richard et al., 1999), aumentando la actividad transcripcional de HIF (Richard et al., 1999) de manera secundaria a su estabilización (Pugh et al., 1997; Srinivas et al., 1999). De esta manera, la expresión de una forma constitutivamente activa de la MAPK fue suficiente para inducir la expresión de genes blanco de HIF (Fukuda et al., 2002).

Se ha reportado también que la actividad de HIF-1 está controlada por la vía de señalización de la insulina/PI3K. La activación de esta vía provoca un aumento en los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$ , induciendo además la transcripción de sus genes blanco (Feldser et al., 1999; Kietzmann et al., 2003; Zelzer et al., 1998). Por otra parte, la actividad de HIF está regulada por el estado redox de la célula (Ema et al., 1999; Huang et al., 1996; Salceda and Caro, 1997). La sobre-expresión de Ref-1 o tiorredoxina aumenta la actividad de un gen reportero de HIF (Ema et al., 1999). Los autores encontraron acumulación de tiorredoxina en el núcleo a bajas concentraciones de oxígeno. Estudios realizados por Carrero y colaboradores (2000) sugieren que la función del factor Ref-1 en células hipóxicas es la de incrementar el reclutamiento de co-activadores transcripcionales tales como SRC-1 y CBP/p300.

Otro mecanismo que modifica a HIF es la conjugación con la proteína SUMO-1 (“*Small Ubiquitin-Modifying Protein*”) (Bae et al., 2004; Shao et al., 2004). Esta modificación post-traduccional ocurre en los residuos de lisina 391 y 477 dentro del ODDD de HIF-1 $\alpha$ , provocando un aumento en su estabilidad y actividad transcripcional (Bae et al., 2004). Finalmente, TGF- $\beta$ 1 (“**T**ransforming **G**rowth **F**actor **B**eta 1”) funciona como regulador negativo de PHD2, tanto a nivel de ARNm como de proteína, lo que incrementa en consecuencia la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  (McMahon et al., 2006).

## RESPUESTA A HIPOXIA EN *Drosophila melanogaster*.

Nuestro laboratorio estudia la respuesta a hipoxia desde una estrategia genética, utilizando a la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como modelo experimental. Si bien, hay grandes diferencias fisiológicas entre insectos y mamíferos, existe un alto grado de conservación evolutiva en los elementos que componen la maquinaria celular de respuesta a hipoxia.

### 6. *Drosophila melanogaster* como sistema modelo.

Si bien los sistemas de levaduras o células en cultivo se han utilizado ampliamente para comprender muchos de los procesos celulares básicos, el estudio de mecanismos que conducen al desarrollo de organismos pluricelulares requiere además de un análisis genético. *Drosophila melanogaster* se ha convertido en uno de los modelos genéticos por excelencia desde que en 1909, el genetista estadounidense Thomas Hunt Morgan comenzó a utilizarla para estudiar las bases de la herencia. Desde entonces, se la ha venido utilizando como organismo modelo para investigación en los campos de la genética clásica, genética molecular y biología del desarrollo.

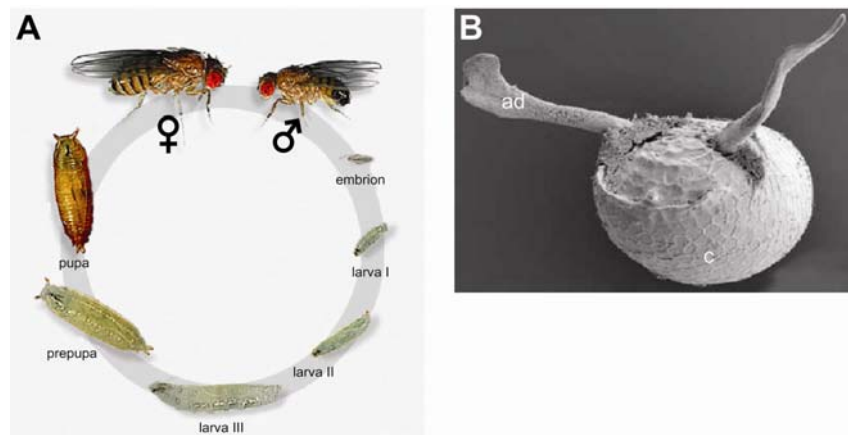
Muchos investigadores trabajan en *Drosophila* porque se ha acumulado un vasto conocimiento sobre su genética, lo que ofrece una amplia comprensión de su biología. Su manipuleo es sencillo y fácil de implementar en el laboratorio, y el ciclo de vida es corto, de apenas dos semanas, lo cual la convierte en un modelo ideal para llevar a cabo estudios genéticos. Otra gran ventaja es que su genoma ha sido secuenciado totalmente (Myers et al., 2000) y la genética de la especie es sencilla por tener cuatro cromosomas: 3 autosómicos y un cromosoma sexual X/Y. El genoma completo codifica alrededor de 13.500 genes con baja redundancia funcional. Existen bancos públicos con colecciones de ESTs (“Expressed Sequences Tags”) y cósmidos que incluyen todo el ADN genómico, así como bases de datos que permiten la búsqueda de secuencias por homología. Además, existen bancos de líneas de moscas de acceso público, con disponibilidad de mutantes para la mayoría de los genes de *Drosophila* (Rasmuson-Lestander, 1995).

En la naturaleza, *Drosophila* se encuentra en abundancia sobre frutas en descomposición. Las moscas adultas y las larvas se alimentan del jugo de frutas y de las levaduras que crecen sobre éstas. La fruta en descomposición ofrece a las larvas un ambiente con limitados niveles de oxígeno y si además le sumamos la competencia de otros microorganismos por dicho gas, se puede anticipar que en *Drosophila* existe una maquinaria de respuesta a hipoxia bien desarrollada.

### 7. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *Drosophila*, desde que el huevo es fecundado hasta que el adulto alcanza la madurez sexual, dura de 10 a 12 días a 25° C. La temperatura afecta en gran medida la velocidad de desarrollo: por ejemplo a 18°C el tiempo de desarrollo dura el doble que a 25°C. Existen cuatro fases en el ciclo de vida de la mosca: embrión, tres estadios larvales, pupa y adulto (**Figura 11**).





**Figura 11.** Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

(A) El ciclo de vida de *Drosophila* dura de 10 a 12 días a 25 grados. Las hembras ponen huevos fecundados (**embrión**) de los que 24 horas más tarde emergen larvas de primer estadio (**larva I**). Estas larvas 24 hs más tarde mudan a larvas de segundo estadio (**larva II**), que 24 hs después mudan a larvas de tercer estadio (**larva III**). Estas últimas permanecen en este estadio durante 48 hs, para luego dar lugar a la **Pupa**. Luego de 4 días de metamorfosis se completa la formación del adulto dentro del pupario. Las moscas adquieren su aspecto final entre 1 y 3 hs después de la eclosión y viven como máximo 60 días a 25°C (figura adaptada de FlyMove-Trends in Geneticc 19, 2003). (B) Fotografía de una vista anterior de un embrión, en la cual se indica el corion (**c**) y los dos apéndices dorsales (**ad**) que permiten el intercambio gaseoso con el ambiente. El embrión es bilateralmente simétrico, pero es asimétrico en su eje dorso-ventral: la superficie dorsal es plana, mientras que la ventral es convexa (figura adaptada de Cell 95(3) 1998, foto de tapa).

Una vez que el huevo es fecundado, por el lapso de 24 horas el embrión se desarrolla experimentando una serie de modificaciones profundas. A pesar de que el desarrollo embrionario es un proceso continuo, fue artificialmente subdividido por Volker Hartenstein y José Campos-Ortega (1985) en 17 estadios, los cuales presentan características prominentes que resultan fácilmente distinguibles al microscopio. Esta clasificación ha sido tomada como referencia en prácticamente todos los trabajos de investigación que utilizan a embriones de *Drosophila*.

Un día después de fecundado el embrión, se produce la eclosión de la **larva**. Las larvas presentan un esqueleto externo compuesto principalmente por quitina y proteínas, que brinda protección y sostén para anclar los músculos del cuerpo. Este exo-esqueleto impone un límite al crecimiento por lo cual dicho crecimiento es discontinuo. Las larvas de *Drosophila* pasan por tres estadios denominados larva I, larva II y larva III. Los estadios larvales en conjunto duran entre 4 y 5 días.

Hacia el final del tercer estadio, la larva deja de alimentarse y abandona el alimento para buscar un lugar seco, donde se inmoviliza e inicia el proceso de metamorfosis, el cual ocurre durante el siguiente estadio del ciclo de vida: la **pupa**. En dicho estadio, que dura entre 4 y 5 días, la mayoría de los tejidos larvales se destruyen para dar origen a las estructuras del adulto. El adulto emerge del pupario y alcanza la madurez sexual aproximadamente 12 horas luego de haber emergido.

## 8. Respuesta a hipoxia en *Drosophila*.

### 8.a) En *Drosophila* existe una respuesta hipoxia similar a la de mamíferos.

La existencia de un factor de transcripción homólogo a HIF-1 en *Drosophila* fue inicialmente inferida mediante ensayos en geles de retardo, en los que se incubaron extractos nucleares de células SL2 de *Drosophila* en normoxia o en hipoxia con oligonucleótidos marcados derivados de los *enhancers* de los genes murinos *eritropoyetina* o *fosfoglicerato kinasa-1* (Nagao et al., 1996).

Más tarde, con el objeto de identificar al factor de transcripción, homólogo a HIF-1 $\alpha$  en *Drosophila*, se siguió una estrategia de genes candidatos en la que se construyeron quimeras uniendo el dominio de unión a ADN de Gal4 con diferentes proteínas bHLH-PAS de *Drosophila* (Bacon et al., 1998). Los autores analizaron la capacidad de inducción dependiente del oxígeno de estas quimeras en células de mamífero Hep3B. Encontraron que solamente la quimera Gal4-Similar (**Sima**) mostró una actividad transcripcional inducible por hipoxia. De acuerdo con esto, demostraron también que Sima se acumula en células SL2 de *Drosophila* bajo condiciones de hipoxia (Bacon et al., 1998). Más recientemente, nuestro laboratorio reportó resultados genéticos *in vivo* mostrando que Sima funciona como homólogo funcional de HIF-1 $\alpha$  en *Drosophila* y que al igual que en mamíferos, está regulada por oxígeno a nivel de su estabilidad proteica, sin mostrar cambios sustanciales en la abundancia de su ARNm (Centanin et al., 2005; Lavista-Llanos et al., 2002). El gen *sima* se expresa de modo ubicuo en el embrión y presenta un 63% de identidad con la secuencia del HIF-1 $\alpha$  humano en el dominio bHLH (Nambu et al., 1996). A diferencia de lo que sucede en mamíferos donde existen tres genes subunidades HIF- $\alpha$  distintas, en *Drosophila* hay un solo gen que codifica para HIF- $\alpha$  (Sima), otorgando una ventaja para analizar *in vivo* su función y regulación.

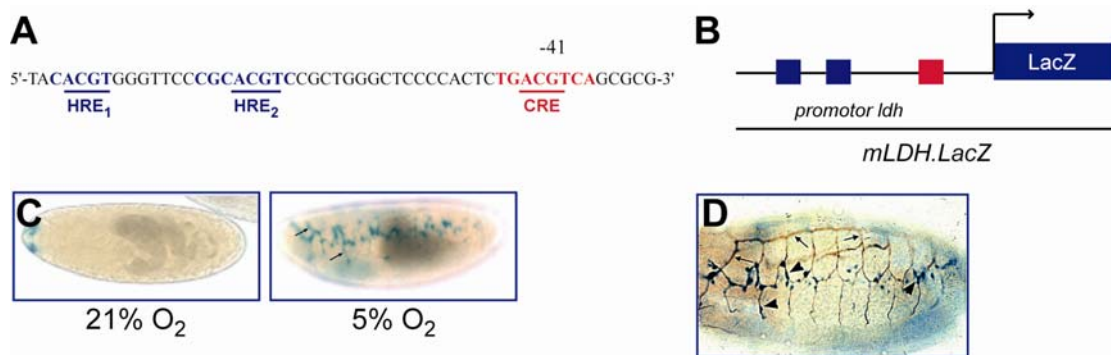
Previamente, se había descubierto que dos proteínas de la familia bHLH-PAS, Single Minded y Tracheless, formaban dímeros con otra proteína de la familia, denominada **Tango**, para llevar a cabo su función como factores de transcripción (Sonnenfeld et al., 1997). Tango presenta alta homología con ARNT, subunidad beta del hetero-dímero HIF-1 de mamíferos. Nuestro grupo encontró que embriones mutantes homocigotas para Tango son incapaces de montar una respuesta transcripcional a hipoxia (Lavista-Llanos et al., 2002).

Estas evidencias en conjunto, permitieron postular a Sima y Tango como los homólogos funcionales a HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ , respectivamente, en *Drosophila* (Bacon et al., 1998; Centanin et al., 2005; Lavista-Llanos et al., 2002; Nambu et al., 1996; Sonnenfeld et al., 1997).

### 8.b) Activación del sistema Sima/Tango en embriones.

Con el propósito de estudiar el patrón de activación de la respuesta a hipoxia en *Drosophila*, nuestro laboratorio generó una línea transgénica que contiene un gen reportero sensible a niveles de oxígeno (Lavista-Llanos et al., 2002). Para ello, se utilizó la secuencia regulatoria (**HRE**) del gen de

la *lactato deshidrogenasa-A* murina (*mLDH-A*) (Figura 12A), gen inducible por hipoxia en *Drosophila* (Abu-Shumays and Fristrom, 1997; Gorr et al., 2004), dirigiendo la expresión del gen bacteriano *lacZ* (*mLDH.LacZ*) (Figura 12B). El *enhancer* de *mLDH-A* incluye dos elementos HRE separados por 8 pares de bases y un elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE) ubicado 16 pares de bases río abajo. El encendido del reportero resultó ser mayor en embriones expuestos a bajos niveles de oxígeno en comparación con los controles mantenidos en normoxia y además, ocurre principalmente en el sistema traqueal (respiratorio) (Figura 12C). Sin embargo, en condiciones de hipoxia más severas, otros tejidos también mostraron inducción del reportero, pero con una sensibilidad menor que el sistema traqueal, sugiriendo que todas las células del embrión son capaces de responder a hipoxia (Figura 12D) (Lavista-Llanos et al., 2002).



**Figura 12.** Inducción de la respuesta transcripcional a hipoxia en *Drosophila*.

(A) Se muestra la secuencia del *enhancer* del gen de la *lactato deshidrogenasa-A* (*ldh-A*) murina, se marcan en azul los sitios HRE, separados por 8 nucleótidos el uno del otro y en rojo el sitio CRE requerido para la máxima activación del *enhancer*. (B) Reportero transcripcional *mLDH.LacZ*: el *enhancer* del gen *ldh-A* murino (*mLDH-A*) dirige la expresión del gen bacteriano *lacZ*. (C) Embriones transgénicos para el reportero *mLDH.LacZ* fueron colocados a 21% o 5% de oxígeno, luego se los fijó y se los incubó con X-gal. La expresión del reportero se restringe a algunas ramas del sistema traqueal (*flechas*) en los embriones incubados en hipoxia. (D) Doble inmunotinción mostrando el lumen traqueal en marrón (*flechas*) y la expresión del reportero por tinción de X-Gal en azul (*cabeza de flecha*). Tomado de Lavista-Llanos 2005, tesis doctoral.

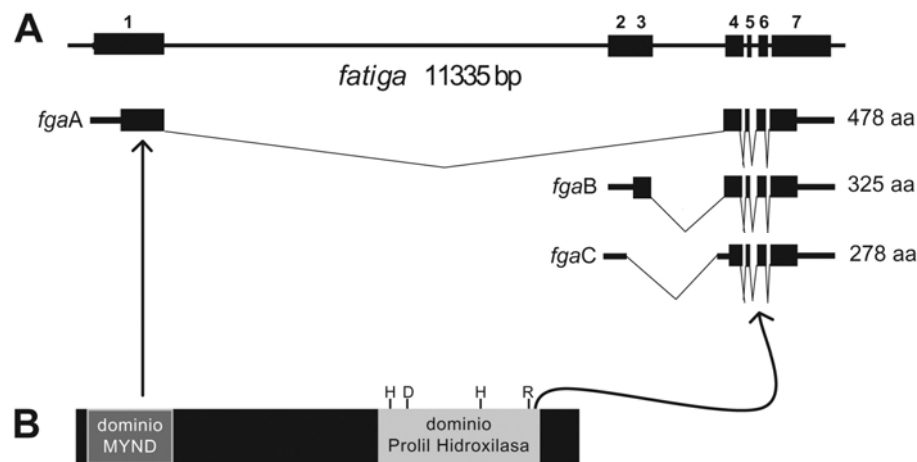
### 8.c) Regulación de Sima por el oxígeno.

#### 8.c.1) Estabilidad proteica.

Resultados obtenidos por la Dra. Lavista-Llanos demostraron que la pérdida de función del gen *VHL*, componente del complejo E3-ubiquitina ligasa VCB (Adryan et al., 2000), provocó la activación de un gen reportero de HIF de manera independiente de la concentración de oxígeno (Lavista-Llanos 2005, tesis doctoral), indicando que la actividad E3-ubiquitina ligasa también regula negativamente a Sima.

En el laboratorio se ha identificado, por homología de secuencias con el gen *EGL-9* de *C. elegans*, a la prolil hidroxilasa que funciona como sensor de oxígeno en *Drosophila* (Centanin et al., 2005; Lavista-Llanos et al., 2002). Este gen, al cual hemos denominado *fatiga*, controla la estabilidad de la proteína Sima. En consecuencia, en los mutantes *fatiga* ocurre la acumulación de Sima (Lavista-Llanos et al., 2002), consistente con un modo conservado de regulación mediado por

la hidroxilación en residuos de prolina. El gen *fatiga* codifica para al menos tres transcritos distintos, denominados *fatigaA*, *fatigaB* y *fatigaC*, que se originan por inicio alternativo de la transcripción y por splicing alternativo (Centanin 2006, tesis doctoral). En la **Figura 13A** se muestra un esquema del locus de *fatiga* indicando el sitio de inicio de la transcripción, el de splicing alternativo y los exones incluidos en cada transcripto. Si bien las tres isoformas comparten el dominio catalítico C-terminal, en el que residiría la actividad hidroxilasa, difieren en sus extremos N-terminal (**Figura 13B**). *FatigaA* presenta una región exclusiva en su extremo N-terminal de alrededor de 200 aminoácidos que contiene un dominio de interacción proteína-proteína del tipo MYND (**Figura 13B**). Experimentos funcionales sugieren que la isoforma más activa es *FatigaB* (Centanin 2006, tesis doctoral).



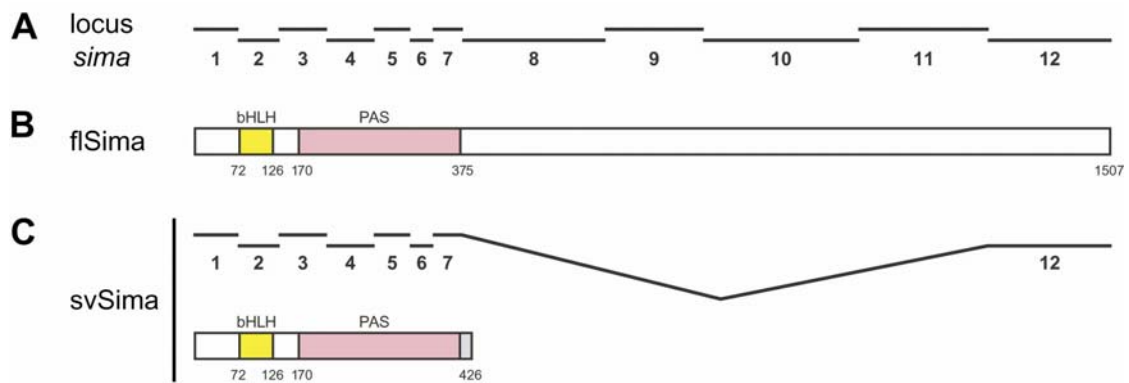
**Figura 13.** El gen *fatiga* codifica para tres transcritos diferentes.

(A) El gen *fga* tiene 7 exones. Los tres transcritos, *fgaA*, *fgaB* y *fgaC*, se generan por una combinación de inicio alternativo de la transcripción y splicing alternativo. La secuencia comprendida entre los exones 4 y 7 codifica para el dominio que confiere actividad prolil hidroxilasa; esta región es común a todas las isoformas. (B) Representación esquemática de la proteína *FatigaA*. Esta isoforma presenta en su extremo N-terminal una región exclusiva que contiene un dominio MYND. Figura tomada de Centanin 2006, tesis doctoral.

### 8.c.2) Splicing alternativo del gen *sima*.

Estudios realizados por Gorr y colaboradores (2004) permitieron identificar dos transcritos del gen *sima* en *Drosophila*: una forma completa denominada **flSima** (“Full Length of Sima”) y una variante corta **svSima** (“Splicing Variant of Sima”)<sup>1</sup> (Gorr et al., 2004). Ambos transcritos poseen el mismo inicio de la transcripción. El ARNm de la flSima contiene 12 exones que codifican para una proteína de 1507 aminoácidos (**Figura 14**).

<sup>1</sup> En adelante utilizaremos el término *Sima* para referirnos al transcripto *flSima*, mientras que al transcripto corto se lo denominará como *svSima*.



**Figura 14.** El transcrit *svSima* es una variante de splicing del gen *sima*.

(A) El gen *sima* está compuesto por 12 exones y genera por splicing alternativo dos transcritos: *flSima* (B) y *svSima* (C). El inicio de la transcripción es el mismo para ambos transcritos. (B) Los 12 exones del locus codifican para la forma completa de *Sima* (1507 aminoácidos). (C) Se muestra un esquema de los exones incluidos en el ARNm de la forma corta de *Sima* (*svSima*) y la secuencia proteica correspondiente. La forma corta resulta de un splicing alternativo entre el exón 7 y el 12, la fusión entre estos exones genera un cambio en el marco de lectura en *svSima*, lo que agrega 7 aminoácidos exclusivos (gris). Las dos proteínas comparten la región N-terminal que incluye los dominios bHLH (amarillo) y PAS (rosado). Figura adaptada de Gorr y colaboradores (2004).

La forma corta resulta de un splicing alternativo que excluye los exones 8 al 11, dando lugar a un transcrit compuesto por los exones del 1 al 7 más el exón 12 (Figura 14). La fusión entre el exón 7 y el exón 12 da lugar a un cambio de marco de lectura, el cual determina que solamente los 19 primeros nucleótidos del exón 12 sean traducidos, generando 7 aminoácidos nuevos en el extremo C-terminal. De esta manera, el transcrit de *svSima* codifica para una proteína de 426 aminoácidos. Se demostró en células S2 que bajos niveles de oxígeno inducen la expresión de *svSima* (Gorr et al., 2004).

Las dos isoformas de *Sima* (i.e. *flSima* y *svSima*) son idénticas en su secuencia aminoacídica entre los residuos 1 al 419, región que contiene los dominios bHLH y PAS necesarios para la unión con el ADN y para la interacción con su *partner* Tango. Se propuso que *svSima* podría funcionar como dominante negativo de *flSima* en condiciones de hipoxia, interfiriendo con la formación del hetero-dímero *Sima*-Tango (Gorr et al., 2004).

El paralelismo entre *svSima* de *Drosophila* e IPAS de mamíferos, dominante negativo de HIF, es evidente. Ambas formas son variantes de splicing inducibles por hipoxia y generan proteínas bHLH-PAS truncadas que no poseen actividad transcripcional. Estos transcritos cortos funcionarían como dominante negativos de *flSima* y de HIF- $\alpha$ , respectivamente, disminuyendo la expresión de genes inducibles por hipoxia (Gorr et al., 2004; Makino et al., 2001; Makino et al., 2002).

### **8.c.3) Regulación de la localización subcelular de Sima.**

Para poder estudiar la regulación de la localización subcelular de Sima fue necesario superar la rápida velocidad de degradación de Sima sobre-expresando a la proteína a través del sistema de levaduras Gal4/UAS (Lavista-Llanos et al., 2002). Se encontró que en normoxia la proteína está localizada mayormente en el citoplasma y en hipoxia se encuentra principalmente en el núcleo, mostrando que al igual que HIF-1 $\alpha$ , Sima está regulada no sólo a nivel de su estabilidad proteica sino también en su localización subcelular (Lavista-Llanos et al., 2002).

En células de mamíferos deficientes para el gen *VHL* la proteína HIF-1 $\alpha$  se encuentra estabilizada de manera independiente del oxígeno, lo cual correlaciona con una fuerte expresión de genes blanco (Maxwell et al., 1999). Esto sugiere que la pérdida de función de *VHL* provocaría una acumulación nuclear de HIF-1 $\alpha$  (Bonicalzi et al., 2001). En este sentido, la Dra. Lavista-Llanos encontró en nuestro laboratorio que en embriones de *Drosophila* homocigotas para una deleción cromosómica, que incluye al gen *VHL*, Sima presenta una localización más nuclear que en los embriones control (Lavista-Llanos 2005, tesis doctoral). Para definir si este efecto era debido específicamente a *VHL* y no a otros genes incluidos en la deleción cromosómica, realizó un rescate específico de *VHL* re-expresando el gen en embriones homocigotas para la deleción. *VHL* restauró la normal localización de Sima en estos embriones en normoxia. Este experimento sugiere que *VHL* es necesaria para la localización citoplasmática de Sima en normoxia.

### **8.c.4) Otros mecanismos que contribuyen a la regulación de Sima.**

El mecanismo de transducción de la señal de la insulina, mediado por la vía PI3K-AKT, está conservado en *Drosophila* (Fernandez et al., 1995; Garofalo and Rosen, 1988; LeRoith et al., 1981). Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que esta vía activa la transcripción dependiente de Sima tanto en células S2 como en embriones (Dekanty et al., 2005). Este efecto de la insulina está mediado por la vía TOR, involucrando tanto un aumento en los niveles de Sima como en su localización nuclear.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

La maquinaria involucrada en la regulación de la estabilidad proteica de Sima controla además su localización subcelular.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Comprender las bases moleculares del control de la localización subcelular dependiente de oxígeno de Sima/HIF-1 $\alpha$ , a través de estudios genéticos y de estructura/función en líneas transgénicas de *Drosophila melanogaster*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

### **Regulación de la Estabilidad Proteica de Sima.**

- Identificar el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) de Sima.
- Identificar los residuos de prolina dentro del ODDD que controlan la estabilidad de Sima.

### **Regulación de la Localización Subcelular de Sima.**

- Importación nuclear de Sima: identificar las Señales de Localización Nuclear (NLSs) funcionales en Sima.
- Exportación nuclear de Sima: identificar las Señales de Exportación Nuclear (NESs) funcionales en Sima y caracterizar el sistema de exportación nuclear de Sima.
- Definir los mecanismos celulares que median la regulación por oxígeno de la exportación nuclear de Sima.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Construcciones de ADN.

### 1.a) Construcciones empleadas en células S2.

**EGFP-ODDD.** La secuencia codificante de *EGFP* se obtuvo por amplificación a partir del plásmido *pEGFP-C1* (Clontech, Inc.) con los primers: sentido (5'-GCTTCGCCGCGGTCTAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3') y antisentido (5'-GCTTCGCCGCGGGGTGGATCCCCGGGCCTGC -3'), que incluyen sitios de restricción para SacII en sus extremos 5'. Luego, se clonó en fase a la secuencia de *EGFP* en un sitio SacII río arriba de la secuencia codificante de *Sima665-1507* en el vector *pcDNA3.1* (Invitrogen) (Bacon et al., 1998). El plásmido con la quimera *EGFP-Sima665-1507* fue utilizado como templado para amplificar la secuencia *EGFP-ODDD* (aminoácidos 665-871), empleando los primers: sentido (5'-GCTTCGCCGCGGTCTAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3') y antisentido (5'-GCTTCGTCTAGACCACATGAGATCCGTCTCCGTTAGC-3'), los cuales incluyen el sitio de restricción XbaI en sus extremos 5'. La quimera fue luego clonada al vector *pMT/Bip/V5-His* (Invitrogen) utilizando la enzima XbaI.

**EGFP-NESODDD.** Forma mutante de la señal de exportación nuclear en el ODDD de *Sima* en el contexto del ODDD aislado en células S2 de *Drosophila*, fue generada por PCR con primers divergentes, empleando el kit comercial: "QuikChange Site-Directed Mutagenesis" (Stratagen), usando como templado el plásmido *pMT/Bip/V5-His-EGFP-ODDD* original. Los primers utilizados fueron: sentido (5'-CTCGGGCAGCGCGCAGGTGCCCATGGCGCCAACCAACATGTC-3') y antisentido (5'-GACATGTTGGTTGGCGCCATGGGCACCTGCGCGCTGCCCGAG-3'), los nucleótidos subrayados corresponden a las Leucinas 689 y 694, las cuales fueron reemplazadas por residuos de alanina.

Las construcciones *EGFP*, *EGFP-SV40-NLS* y *EGFP-NES* en *pMT/Bip/V5-His* fueron gentilmente cedidas por el Dr. Christos Samakovlis, Universidad de Estocolmo, Suecia (Roth et al., 2003).

**EGFP-NLS2**, sus respectivas formas mutantes, y **EGFP-ODDD1-3** fueron generadas por clonado en fase de los distintos elementos amplificados por PCR en el extremo C-terminal del plásmido *pMT/Bip/V5-His-EGFP*, usando los sitios XbaI y NotI (Roth et al., 2003). La fusión *EGFP-NLS2* fue generada por amplificación de la señal de localización nuclear de *Sima* con los primers: sentido (5'-GCTCTAGAGGCGGAGGTAAGCGCCACCTGAACAGCGCG-3') y antisentido (5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTACTTCAGACGCTTGGACTCCACG-3'). Para obtener las diferentes formas mutantes de la *EGFP-NLS2*, reemplazamos los oligonucleótidos anteriores por oligonucleótidos conteniendo las mutaciones necesarias. Para el caso del **Mutante 1** de *EGFP-NLS2*, primera región básica de la señal bipartita, usamos el primer sentido mutado (5'-

GCTCTAGAGGCGGAGGTACGCGCCACCTGAACAGCGCG-3') y el primer antisentido WT. Para la **Mutante 2** de **EGFP-NLS2** empleamos el primer sentido WT y el antisentido mutado (5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTACTTCAGACGCGTGGACTCCACG-3'). La **Doble Mutante** de **EGFP-NLS2** fue generada por amplificación de la secuencia usando los dos primers mutados. Las fusiones **EGFP-ODDD1-3** fueron generadas por amplificación de una región dentro del ODDD empleando los primers: sentido (5'-GCTCTAGAGCCTCCACCAATTGCATTC-3') y antisentido (5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTAGGTATTGCTGGGTGCAGA-3') para **EGFP-ODDD1**; sentido (5'-GCTCTAGATCTGCACCCAGCAATACCA-3') y antisentido (5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTACTCCTCGCGATAGTTGAACAG-3') para **EGFP-ODDD2**; y sentido (5'-GCTCTAGACTGTTCAACTATCGCGAGGAG-3') y antisentido (5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTACATGAGATCCGTCTCCGTTAG-3') para **EGFP-ODDD3**.

### 1.b) Construcciones empleadas en líneas transgénicas de *Drosophila*.

#### 1.b.1) Construcciones de *Sima*.

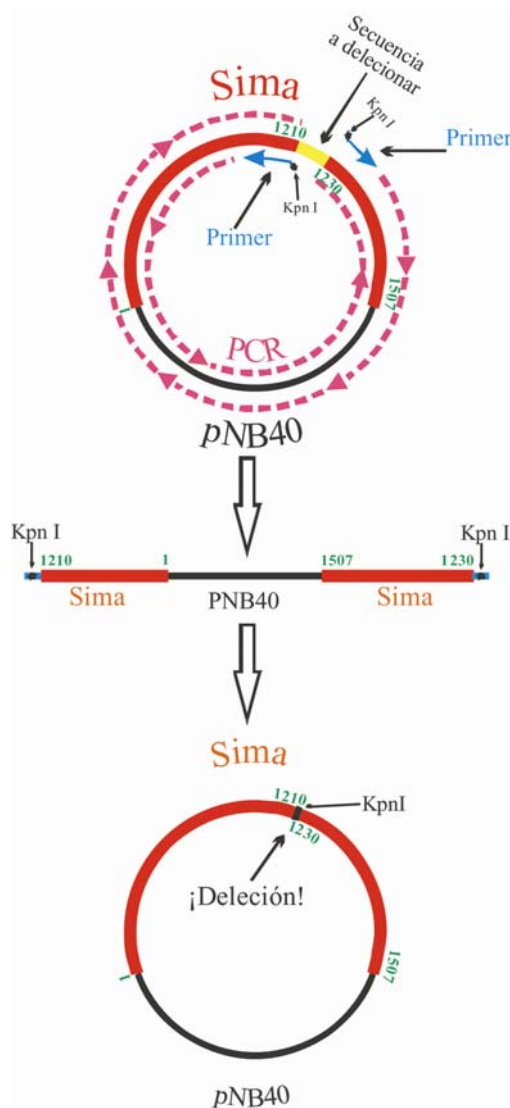
Las diferentes construcciones de *Sima* (ADN copia de 5,8 kb) se realizaron en el vector pNB40 y luego fueron clonadas a *pPCaSpeR-UAS* (Brand and Perrimon, 1993) usando EcoRI y NotI.

##### 1.b.1.1) Formas delecionadas de *Sima*.

***SimaΔ971-1507*** fue generada por deleción de la región 3' del gen con las enzimas BamHI/NotI; luego los extremos fueron completados usando la polimerasa Klenow y re-ligados.

***SimaΔ1252-1507*** fue obtenida al restaurar el fragmento BamHI/BamHI (nucleótidos 3523-4358) a la forma delecionada *SimaΔ971-1507*.

***SimaΔ1210-1229*** fue generada por PCR usando como templado a la forma completa de *Sima*, empleando los primers divergentes: sentido (5'-GCTTCGGGTACCGTTTCCATGCTGCTGCTGCTGC-3') y antisentido (5'-GCTTCGGGTACCAGCGGAACCCTCTGCCTGGAC-3'), los cuales incluyen un sitio de restricción KpnI en sus extremos 5' (**Figura 15**). Luego, el producto de la amplificación fue digerido con KpnI y re-ligado.



**Figura 15.** Estrategia para generar deleciones utilizando primers divergentes que amplifican todo el plásmido.

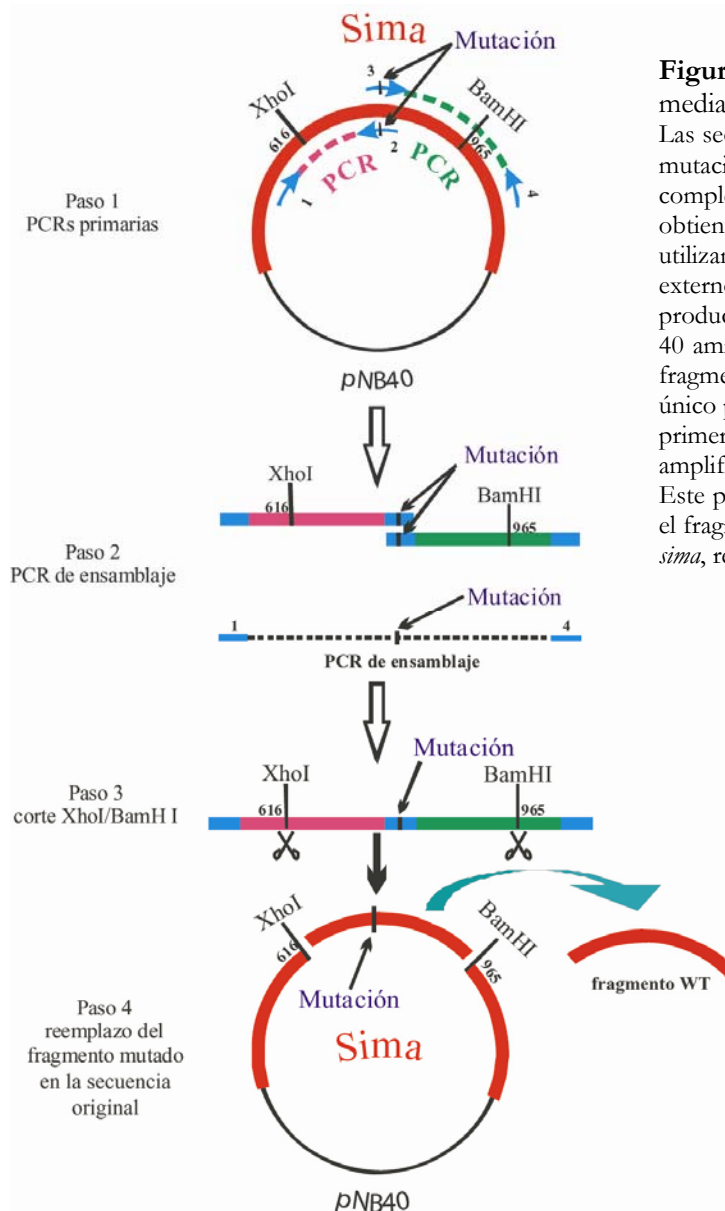
Se esquematizan los pasos utilizados para deleccionar los aminoácidos 1210-1229 (tomada como ejemplo) de la proteína *Sima*. Los primers, que incluyen un sitio de restricción para *KpnI*, son divergentes de manera que dan lugar a un producto de amplificación que incluye al vector *NB40* en el centro, flanqueado por segmentos de la secuencia de *Sima* (residuos 1210-1 y 1507-1230). Luego de digerir con *KpnI*, el producto se circulariza por ligación de los extremos cohesivos, obteniendo un plásmido con la proteína *Sima* delecionada.

Para generar *Sima* $\Delta$ *ODDD* se aplicó el mismo esquema que para *Sima* $\Delta$ *1210-1229*: Se amplificó por PCR usando como templado a la secuencia completa en el plásmido *pNB40-sima*, empleando los primers divergentes: sentido (5'-GCTTCGGGTACCCATGAGGCCAACCAACATGTCAC-3') y antisentido (5'-GCTTCGGGTACCCTAACGGAGACGGATCTCATGTGG-3'), los cuales incluyen sitios de restricción *KpnI* en sus extremos 5'. Luego, el producto de la amplificación fue digerido con *KpnI* y re-ligado.

#### 1.b.1.2) Formas mutantes de *Sima*.

*Sima**P850A* fue generada por PCR de ensamblaje (Figura 16). Con esta técnica se obtuvieron dos productos de amplificación por separado: el primero correspondiente a un producto de 874 pares de bases generado con los primers: 1) sentido 5'-GCTTCGGGTACCTCGGTGACCGCTTCGGTCCTC-3' y 2) antisentido 5'-

CATCATCGATCGGGATGTAGGCCGACGCATGGCAAAGGC-3' (que incluye el codon - subrayado- para reemplazar al residuo de prolina 850 por alanina) y un segundo producto de amplificación (1677 pares de bases) con los primers: 3) sentido 5'-GCCTTTGCCATGCGTGCGGCCTACATCCCGATCGATGATG-3' (que incluye el codon mutado) y 4) antisentido 5'-GCTTCGGGTACCAGACCCCGATGCCCCATCCATC-3'. Estos dos productos de PCR se superponen en la secuencia correspondiente a los primers que contienen la mutación. Luego, alícuotas de estos dos productos de amplificación fueron mezcladas para ser usadas como templado para una tercera reacción de PCR utilizando los primers 1) y 4). El nuevo producto de amplificación fue digerido con XhoI/BamHI, para reemplazar con el fragmento resultante de 1060 pares de bases (incluyendo la mutación P850A) al fragmento WT correspondiente en *NB40-sima*.



**Figura 16.** Estrategia de mutagénesis mediante PCR de ensamblaje. Las secuencias de los primers que contienen la mutación (indicadas en azul como 2 y 3) son complementarias. En un primer paso se obtienen dos productos de amplificación, utilizando los primers 2 y 3, y dos primers externos accesorios (1 y 4). Estos dos productos de amplificación se superponen en 40 aminoácidos. En un segundo paso, los dos fragmentos amplificados se ensamblan en un único producto de amplificación, utilizando los primers accesorios (1 y 4). Este producto de amplificación incluye la mutación de interés. Este producto se digiere con XhoI y BamHI y el fragmento resultante es insertado en *pNB40-sima*, reemplazando a la secuencia nativa.

Para generar las formas mutantes ***SimaP696A/SimaP747A/SimaNESODDD*** se utilizó la misma estrategia empleada para *SimaP850A*, cambiando solamente los primers que incluyen al codon mutado -2) y 3)- por los primers correspondientes. Para el caso de ***SimaP696A*** los primers usados fueron: sentido (5'-CACCTGCCTGCTGGCCGAGGATATCAATTC-3') y antisentido (5'-GAATTGATATCCTCGGCCAGCAGGCAGGTG-3'). Para el caso de ***SimaP747A*** los primers usados fueron: sentido (5'-CAGCCCGCTCACAGCCAATTCCACGGCAAC-3') y antisentido (5'-GTTGCCGTGGAATTGGCTGTGAGCGGGCTG-3'). Para obtener la forma mutante ***SimaNESODDD*** empleamos los primers: sentido (5'-CTCGGGCAGCGGCAGGTGCCCATGGCGCCAACCAACATGTC-3') y antisentido (5'-GACATGTTGTTGGCGCCATGGGCACCTGCGCGCTGCCCGAG-3').

El transcripto ***svSima*** fue cedido gentilmente por el Dr. Thomas Gorr de la Universidad de Zurich (Gorr et al., 2004), el cual fue luego clonado en el vector *pCaSpeR-UAS* usando las enzimas XbaI/NotI.

#### **1.b.2) Otras construcciones.**

***pCaSpeR.UAS-EGFP*** la secuencia codificante de *EGFP* fue obtenida por amplificación a partir del plásmido *pEGFP-C1* (Clontech, Inc.), utilizando los primers: sentido (5'-GCTTCGCCGCGGTCTAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3') y antisentido (5'-GCTTCGCCGCGGGTGGATCCCGGGCCTGC-3'), que incluyen sitios de restricción para SacII en sus extremos 5'. Una vez amplificada, la secuencia fue clonada directamente en el sitio SacII del vector *pCaSpeR-UAS*.

***pCaSpeR.UAS-EGFP-NES*** se obtuvo por sub-clonado de la secuencia *EGFP-NES* a partir del plásmido *pMT/Bip/V5-His-EGFP-NES* (Roth et al., 2003) en el vector *pCaSpeR-UAS*, empleando las enzimas XbaI y NotI.

***pCaSpeR.UAS.embargoed*** fue generada por amplificación de la secuencia completa del gen *embargoed* a partir del ADN copia de un EST comercial (EST LD45706, Open Biosystems Company) con los primers: sentido (5'-GCTCTAGACTCACAAATTGCATTTTCGCA-3') y antisentido (5'-GCTCTAGAACTGGCTGGGCATCTTA-3'), que contenían sitios de restricción para XbaI en sus extremos 5'. Luego de la digestión, el fragmento fue clonado en el mismo sitio del vector *pCaSpeR-UAS*.

***pCaSpeR.UAS.VHL*** fue obtenida por amplificación usando como templado al ADN genómico extraído de embriones de *Drosophila*. Se emplearon los primers: sentido (5'-GCTTCGGGATCCTGCTGGAGATGGCGCTCCAAATAG-3') y antisentido (5'-GCTTCGGGATCCAAGATGATTACCCGCCCTCTTAACT-3'). El producto de amplificación fue clonado en el vector *pCR4Blunt-TOPO* (Invitrogen), para luego sub-clonarlo al vector *pCaSpeR-UAS* empleando la enzima EcoRI.

## 2. Transfección de células S2 con proteínas de fusión a EGFP.

Todas las construcciones empleadas para transfectar células S2 de *Drosophila* fueron clonadas en el vector *pMT/Bip/V5-His* (Invitrogen). Las células fueron cultivadas a una temperatura de 25°C en medio Scheineider de *Drosophila* (Sigma), conteniendo 10% de suero fetal bovino (Gibco), 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Las transfecciones se realizaron con un total de 5 µg/ml de ADN utilizando el método de transfección con fosfato de calcio (Invitrogen). Veinticuatro horas luego de la transfección, la expresión de las proteínas recombinantes fue inducida por agregado de 0,4 mM de sulfato de cobre durante 5 horas. Las células fueron observadas en un microscopio confocal (Carl Zeiss, LSM5, Pascal). Para el tratamiento de las células con Leptomicina B (LMB, Sigma), se aplicó dicha droga a una concentración final de 30 mM durante 2 horas luego de inducir la expresión del plásmido durante 5 horas con sulfato de cobre y el resultado fue visualizado inmediatamente después en el microscopio confocal. Para marcar los núcleos se utilizó el reactivo de Hoechst 33342, a una concentración final de 2,24 µg/ml durante 5 minutos.

## 3. Líneas de moscas utilizadas.

Reportero transcripcional: La línea *Idh.LacZ* fue generada previamente en el laboratorio (Lavista-Llanos et al., 2002).

Líneas Gal4: La línea *en.Gal4/CyO* (generada por K. Yoffe y A. Brand) fue gentilmente provista por Ana Macias de la Universidad Nacional de Córdoba. *hs.Gal4* (Ruberte et al., 1995) del tercer cromosoma proviene del laboratorio de Benny Shilo del Instituto Weizmann, Israel.

Líneas UAS: La línea *UAS.sima* fue generada previamente en el laboratorio (Lavista-Llanos et al., 2002). La línea *UAS.CD8GFP* fue cedida por Benny Shilo, Instituto Weizmann, Israel. La línea *UAS.GFPn.lacZ* fue cedida por Shigeo Hayashi del “Riken Center for Developmental Biology” de Kobe, Japón. Las líneas *UAS.fatigaA* y *UAS.fatigaB* fueron generadas por Lázaro Centanin en nuestro laboratorio.

Líneas mutantes: *emb<sup>2</sup>* y *emb<sup>3</sup>* fueron cedidas por Christos Samakovlis, Universidad de Estocolmo, Suecia (Roth et al., 2003). *Df(2R)en-A/CyO* y *Df(2L)N22-14/CyO* fueron cedidas por M. Ashburner. *I(2)k16715* y *Df(3R)3-4* provienen del Banco de moscas de la Universidad de Indiana en Bloomington, USA. *fatiga<sup>1</sup>* fue generada por Lázaro Centanin en el laboratorio (Centanin et al., 2005).

## 4. Moscas transgénicas.

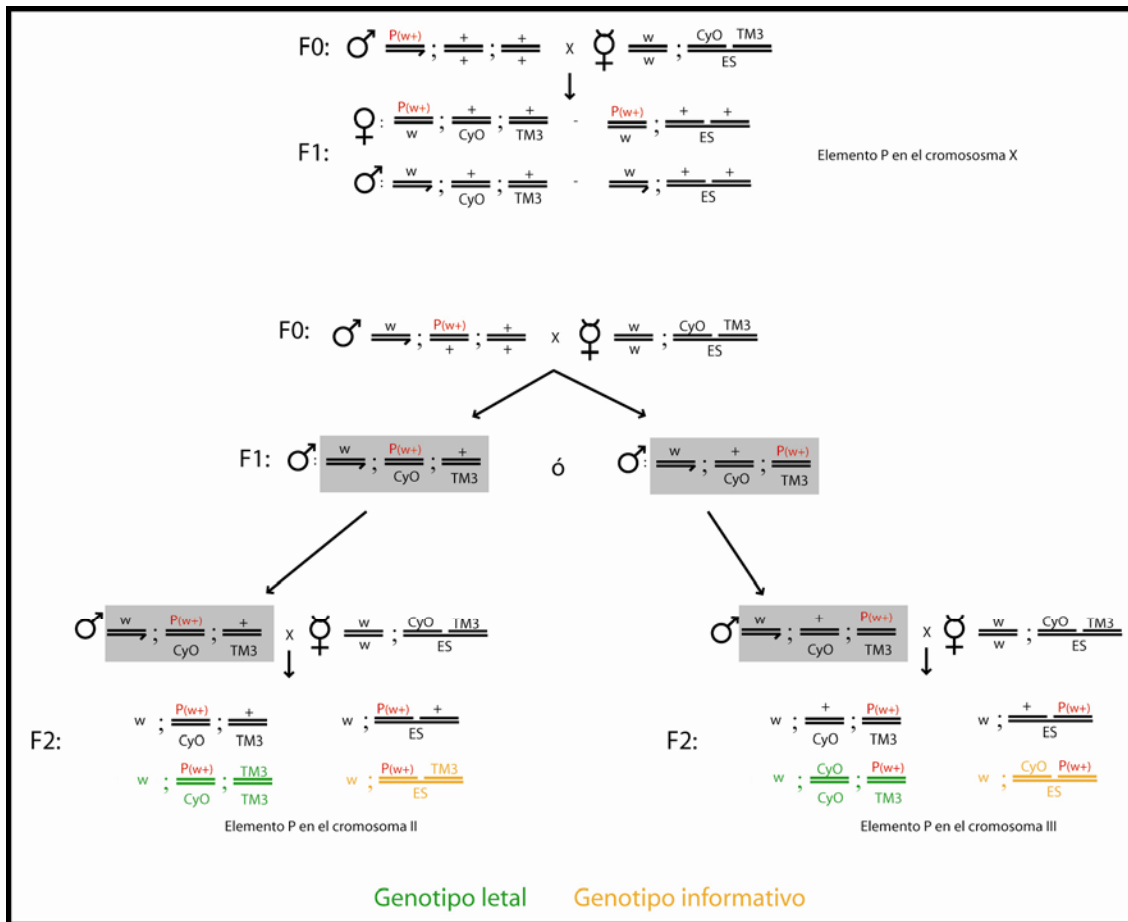
Las líneas transgénicas fueron generadas por transformación de la línea germinal mediada por **Elementos P**. Las construcciones de ADN en el vector *pCaSpeR* se inyectaron junto a un plásmido *helper*, que codifica para la enzima Transposasa, en embriones *yw* no más de 30 minutos luego de la

ovipuesta, los cuales fueron previamente inmovilizados sin decorionar sobre una cinta adhesiva de doble faz pegada a un portaobjetos. Para inyectar los embriones utilizamos capilares Narishige de 1mm x 90mm, los cuales fueron previamente confeccionados en un estirador vertical Narishige PC-10 (en dos etapas a 63 °C y 68.9 °C, respectivamente). La solución de inyección conteniendo 0,4µg/µl del ADN *pCaSpeR-UAS* y 0,25µg/µl de plásmido *T-helper* en 10µl de búfer de inyección [5mM KCl, 0,5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.8], fue previamente centrifugada durante 10 minutos a 10000g y transferida a un nuevo tubo. Los embriones fueron inyectados bajo un microscopio *Olympus* BH, sumergidos en aceite halocarbonado 700 (Sigma H8898) para evitar la deshidratación, utilizando un microinyector *Tranjector* 5246 (Eppendorf). Una vez inyectados, los embriones se dejaron desarrollar a 18°C durante 48 horas. Las larvas que emergieron durante las siguientes 24 horas fueron transferidas a un vial con medio de cultivo. Los adultos obtenidos fueron cruzados en forma individual con moscas *yw* y de la progenie obtenida, se eligieron moscas con ojos amarillos, naranja o rojos, lo cual denota la presencia del elemento P integrado en el genoma. Las inserciones en las líneas transgénicas fueron mapeadas utilizando cromosomas balanceadores (ver más adelante) y luego se establecieron líneas estables.

## 5. Mapeo de las líneas transgénicas.

Con el objeto de determinar en qué cromosoma quedó insertado el elemento P realizamos un mapeo por análisis de segregación del marcador dominante mini-white ( $w^+$ ). Para ello, cruzamos machos conteniendo el gen de interés (ojos rojos por el marcador  $w^+$ ) con hembras conteniendo dos cromosomas balanceadores (**DB**), en las que los cromosomas II y III tienen marcadores dominantes en el estadio adulto (poseen ojos blancos,  $w^-$ ). Si el elemento P está inserto en el cromosoma X, el marcador  $w^+$  es heredado solamente por las hembras pero no por los machos de la F1 (**Figura 17 panel superior**). En cambio, si el gen de interés está inserto en el segundo o en el tercer cromosoma, se obtendrán en la F1 machos que llevan el transgen y ambos marcadores de los cromosomas balanceadores simultáneamente. Para definir en qué cromosoma autosómico se encuentra la inserción, se realiza un segundo cruzamiento, donde los machos candidatos son cruzados por hembras DB. En la progenie de este segundo cruzamiento se analiza si el marcador  $w^+$  del transgen co-existe con el marcador dominante del segundo o del tercer cromosoma. El elemento P segregará de manera excluyente con respecto al marcador del cromosoma en el que se encuentra inserto, mientras que co-existirá con el marcador del cromosoma en el que no se ha insertado (**Figura 17 panel inferior**).





**Figura 17.** Mapeo cromosómico por análisis de segregación.

Se muestra el esquema de cruzamientos para identificar, mediante análisis de segregación, en qué cromosoma se encuentra insertado un elemento P. Este último contiene como marcador fenotípico al gen *mini-white* ( $W^+$ ), el cual otorga color de ojos rojos a la línea que lo porta (la línea original tiene ojos blancos,  $W^-$ ). Además, se utiliza una línea denominada **DB** ( $W^-$ ), la cual porta dos cromosomas balanceadores (del segundo y tercer cromosoma) con marcadores dominantes en el adulto (II: CyO, III: TM3). Ambos cromosomas balanceadores segregan de manera dependiente y sus cromosomas homólogos están fusionados formando una única unidad (cromosoma **ES**). **Panel Superior:** La herencia del marcador  $W^+$  en el 100% de las hembras de la F1 determina que el elemento se encuentra inserto en el cromosoma X. **Panel Inferior:** Si el elemento P está en el cromosoma II o en el cromosoma III, en la F1 se obtienen machos  $W^+$  con uno u otro cromosoma balanceador. Estos machos son cruzados por hembras DB y se analiza en la progenie (F2) qué cromosoma balanceador segregó con el elemento P. El transgén segregará de manera excluyente con respecto al cromosoma balanceador en el que se encuentra inserto. Figura tomada de Acevedo 2006, tesis de licenciatura.

## 6. Recombinación homóloga.

En *Drosophila* la recombinación meiótica ocurre únicamente en la hembra. La frecuencia de recombinación resulta proporcional a la distancia entre las entidades a recombinar; cuanto mayor sea la distancia entre ellas mayor es la probabilidad de recombinación. Dado que en la mayoría de los casos no sabíamos donde estaban ubicadas las entidades a recombinar, en general se analizaron entre 50 y 100 individuos para cada intento inicial de recombinación.

Para generar líneas recombinantes se parte de hembras trans-heterocigotas para los dos

elementos a recombinar, para luego cruzarlas con machos balanceados en el cromosoma de interés. De la progenie, se recuperan machos individuales balanceados, a los que se les analiza la presencia de ambas entidades a recombinar. El esquema de cruzamientos para llevar a cabo este análisis depende del marcador que lleve cada transgen. Por ejemplo, cuando los dos elementos P tienen al gen *mini-white<sup>+</sup>* como marcador, las moscas recombinantes se identificaron por la sumatoria del color de ojos de cada uno de los elementos P individuales. Cuando un elemento a recombinar es una mutación letal en homocigosis, la identificación se realiza mediante ensayos de letalidad por retrocruzas contra la línea parenteral.

## **7. Mantenimiento de Stocks.**

Las líneas de *Drosophila* utilizadas en los experimentos de esta tesis, se mantuvieron en medio de cultivo estándar preparado a base de harina de maíz, agar, levadura, sacarosa, Nipagin y ácido propiónico, en viales de vidrio de 2,5 cm de diámetro y 15 cm de largo. Para la amplificación de las líneas de interés, se utilizaron botellas con mayor capacidad (aproximadamente 250 cm<sup>3</sup>) conteniendo el mismo medio de cultivo. El laboratorio cuenta con incubadoras que mantienen condiciones controladas de temperatura para el mantenimiento de las líneas. De acuerdo con los requerimientos de cada experimento, los viales o botellas fueron mantenidos a 25°C o 18°C, pudiendo ser incubados por períodos cortos a 37°C (condiciones de *heat shock*). Para llevar a cabo los cruzamientos, hembras vírgenes y machos fueron anestesiados sobre una plataforma gaseada con CO<sub>2</sub> y colocados en un mismo vial. Típicamente, cada cruzamiento se realizó con unas 20 hembras vírgenes y unos 5-10 machos, que fueron mantenidos durante dos o tres días a 25°C para una óptima ovipuesta. Esto permite que la progenie quede relativamente sincronizada, eclosionando las larvas en el término de dos a tres días.

## **8. Recolección sincronizada de embriones, tratamientos de hipoxia y pulsos de calor.**

Para obtener embriones sincronizados en el desarrollo se reemplazaron las placas de ovipuesta, cada media hora. Los embriones fueron luego mantenidos a 25°C hasta alcanzar el estadio embrionario deseado. Los embriones fueron sometidos a hipoxia regulando las proporciones de oxígeno y nitrógeno en un incubador Forma Scientific 3131, a 25°C. Los pulsos de calor se realizaron en un baño de agua a 37°C, haciendo flotar las placas de ovipuesta durante 20 minutos e incubándolas luego a 25°C hasta el final del experimento.

## **9. Inmunofluorescencia de embriones.**

Se utilizaron los anticuerpos primarios: **anti-β-gal** (1/1200) generado en conejos (Cappel, Molecular Probe), **anti-Sima** (1/300) generado en ratas (Bacon et al., 1998), **anti-Trh** (1/300)

(ratas) (Wappner et al., 1997), **anti-Tgo** (1/100) (ratón) (Ward et al., 1998), **anti-GFP** policlonal (1/1200) generado en conejos (Molecular Probes) y **anti-Engrailed** (1/10) monoclonal (Molecular Probes). Todos los anticuerpos secundarios utilizados (conjugados a Cy2 o Cy3) fueron de Jackson Laboratories. Los embriones, larvas y adultos se visualizaron por microscopía de fluorescencia o de Nomarski en un microscopio Olympus BX-60, o por microscopía confocal en un microscopio Carl Zeiss LSM5 Pascal.

Los embriones se colectaron en placas de agar luego de ovipuestas sincronizadas u ovipuestas durante toda la noche (ON) y fueron dejados desarrollar por tiempos variables, según el experimento. Los embriones fueron luego decorionados en una solución de hipoclorito de sodio 2.5%, filtrados y enjuagados con agua destilada y luego transferidos a un tubo *eppendorf* donde fueron fijados en una solución 1:1 heptano:fijador [3.7% formaldehído en PT] con agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, el fijador (fase inferior) fue reemplazado por metanol, luego de lo cual se removió la membrana vitelina de los embriones con agitación fuerte, enjuagando varias veces con metanol. Los embriones fueron luego re-hidratados incubándolos 5 minutos en 1:1 metanol:PT y finalmente, 5 minutos en PT. Luego, se bloquearon en 10% de albúmina sérica bovina (BSA) en PT durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente, fueron incubados con el anticuerpo primario en PT (la dilución varía en cada caso) durante 4 horas a temperatura ambiente u ON a 4°C. Se removió el anticuerpo primario y se hicieron tres lavados con PT durante 20 minutos con agitación. Los anticuerpos secundarios fueron incubados en PT con 10% de suero normal de cabra en una dilución típicamente de 1:150 durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de remover el anticuerpo secundario, los embriones fueron lavados otras tres veces en PT durante 20 minutos con agitación. Dado que los anticuerpos secundarios están conjugados a compuestos fluorescentes, los embriones fueron luego incubados en 200µl de glicerol 80% en PT a 4°C en la oscuridad durante al menos 4 horas y luego montados para su observación al microscopio.

## **10. Hibridización in situ de ARNs mensajeros.**

Las sondas se sintetizaron utilizando rUTP marcado con Digoxigenina (DIG) (Roche). Como templado se utilizaron productos de PCR en los que el *primer* reverso contenía el promotor de la RNA Pol T7. El fragmento de PCR fue purificado por columna (GFX™ Amersham Bioscience) y las sondas se sintetizaron a partir de 1µg de templado utilizando el kit *DIG RNA probe* (Roche). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10µl, en presencia de una mezcla de ribonucleótidos marcados con DIGoxigenina-11-UTP (10 mM (ATP, CTP, GTP), 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-11-UTP, pH 7.5), inhibidor de RNAsa (RNAsin, Biolabs, 20 unidades/µl) y la RNA Polimerasa del fago T7 (20 unidades/µl) (Roche Diagnostics), durante 2 horas a 37°C. Una alícuota del producto de reacción fue analizada por electroforesis en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio, en un documentador de geles con luz UV. El producto de reacción fue precipitado en etanol

(volumen final de 300 $\mu$ l) con 80mM LiCl, 5mM EDTA y 0.1mg/ml tRNA y finalmente resuspendido en 10 $\mu$ l H<sub>2</sub>O DEPC para su almacenamiento a 20°C.

Embriones de genotipos *yw*, *en.Gal4/UAS.embargoed* y *en.Gal4/UAS.VHL*, fueron decorionados y fijados en un tubo *ependorff* conteniendo 1:1 n-heptano:fijador [formaldehído 10% en PBS] durante 20-30 minutos a temperatura ambiente con agitación. A los embriones se les quitó la membrana vitelina con metanol, luego se los re-hidrató con diluciones seriadas de MetOH-PTW [1xPBS, 0.1% Tween 20] hasta llegar a 100% PTW. Los embriones fueron fijados nuevamente durante 20 minutos en 5% de formaldehído en PTW y luego de 6 lavados de 2 minutos en PTW, fueron lavados durante 5 minutos en 1:1 PTW:solución de hibridización (50% formamida, 5X SSC, 50 $\mu$ g/ml heparina, 0.1% Tween 20), a la que se le agregó 1mg/ml de tRNA (Sigma) y 100  $\mu$ g/ml de DNA de esperma de salmón (Sigma). Los embriones se pre-hibridizaron durante 1 hora (o más) en solución de hibridización 100% a 50°C con agitación y luego se hibridizaron en 100  $\mu$ l de solución de hibridización conteniendo la sonda (1 $\mu$ l de sonda marcada en 100 $\mu$ l de solución), durante toda la noche a 50°C con agitación. Los embriones se lavaron una vez durante 10 minutos en 750 $\mu$ l de solución de hibridización a 50°C, luego 10 minutos en 1:1 solución de hibridización:PTW a 50°C y posteriormente se realizaron cinco lavados durante 15 minutos en PTW a 50°C. Finalmente, los embriones fueron lavados una última vez en PTW a temperatura ambiente y luego se bloqueó con 10% de suero de oveja en PTW durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Boehringer, Mannheim) diluido 1/3000 a 4°C durante toda la noche. Luego de dos lavados con PTW los embriones fueron incubados con 250 $\mu$ l de solución de tinción (100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris 9.5, 0.1% Tween 20 en H<sub>2</sub>O DEPC) conteniendo 5 $\mu$ l del sustrato NBT/BCIP (18.75mg/ml NBT y 9.4mg/ml BCIP en 67 % dimetilsulfóxido (DMSO) v/v, Boehringer Mannheim). El desarrollo del color se monitoreó bajo lupa binocular y la reacción se frenó transfiriendo los embriones a PTW. Los embriones se lavaron dos veces en PTW durante 10 minutos y finalmente se incubaron en glicerol 70% en PTW a 4°C durante al menos 3 horas. El patrón de expresión resultante fue analizado y documentado bajo el microscopio de campo claro (Olympus BX-60) empleando una cámara digital (CoolSnap Pro utilizando el software Image PRO-Plus 5.1).

## **11. Estudios de la localización subcelular de Sima durante la re-oxigenación.**

La Lic. Nuria Romero, tesista doctoral en el laboratorio, puso a punto un método para estudiar la cinética de exportación de Sima en embriones luego de la re-oxigenación. Brevemente, los embriones que sobre-expresan Sima fueron expuestos a una atmósfera de 1% de oxígeno durante cuatro horas, condición en la cual Sima está localizada en el núcleo. Luego, los embriones fueron transferidos nuevamente a normoxia y fijados a diferentes tiempos (2.5, 5, 7.5, 10, 15 y 20 minutos) post-reoxigenación. La localización subcelular de Sima para cada tiempo y cada estadio del desarrollo embrionario se determinó por inmunofluorescencia anti Sima.

## **12. Análisis de la localización subcelular de las fusiones a EGFP en células S2 de *Drosophila*.**

El análisis cuantitativo de la localización subcelular de las diferentes fusiones a EGFP fue realizado en un microscopio Confocal (Carl Zeiss, LSM5, Pascal) midiendo la intensidad de fluorescencia por  $\mu\text{m}^2$  en el núcleo (N) y en el citoplasma (C) y determinando luego la relación núcleo:citoplasma (N:C) (Roth et al., 2003). Se utilizó el test estadístico “t-Test” de dos colas asumiendo igual varianza, con  $N > 21$ .

## **13. Análisis de la localización subcelular de variantes de Sima en embriones de *Drosophila*.**

### **13.a) En estado de equilibrio.**

Cada embrión fue clasificado, en función de la localización subcelular de Sima, en alguna de las siguientes categorías:

**Citoplasmática:** En la que Sima se encuentra excluida del núcleo en más del 90% de las células que expresan la proteína.

**Nuclear:** donde la proteína aparece localizada en el núcleo en más del 90% de dichas células.

**Ubicua:** donde ninguna de las dos categorías anteriores llegó al 90%.

Se analizaron como mínimo 40 embriones para cada condición (concentración de oxígeno o estadios embrionarios). Luego, calculamos el porcentaje de embriones asignados a cada categoría y las distribuciones entre las categorías de los distintos genotipos fueron comparadas empleando el test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

### **13.b) Ensayos de re-oxigenación.**

En los ensayos de re-oxigenación se analizaron dos muestras independientes por genotipo y por condición (concentración de oxígeno o estadios embrionarios), contando como mínimo 30 embriones por experimento. Se aplicaron dos tipos de análisis estadísticos para comparar los diferentes genotipos:

1) Test de **Kaplan-Meyer:** permite analizar si existe diferencia estadísticamente significativa entre dos curvas a lo largo del tiempo luego de la re-oxigenación. Este test estadístico es ampliamente empleado para analizar curvas de supervivencia.

2) **Tiempo Medio de Exportación (TM):** definido como el tiempo luego de la re-oxigenación para el cual el 50% de los embriones pasaron de la categoría “nuclear” a la categoría “ubicua” o “citoplasmática”. Este dato se obtuvo a partir de la ecuación de la curva exponencial que mejor ajusta a los datos para una condición dada.

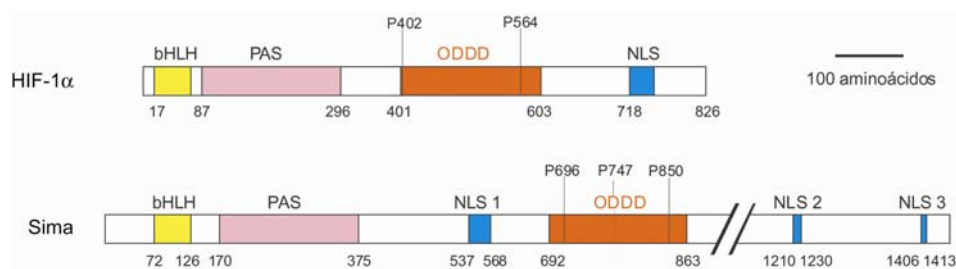
## **RESULTADOS**

## 1. Regulación de la Estabilidad Proteica de Sima.

En mamíferos se ha demostrado que la regulación de HIF depende en parte de la estabilidad diferencial de su subunidad alfa, la cual es degradada en forma dependiente de oxígeno. En normoxia dos residuos de prolina localizados dentro del Dominio de Degradación Dependiente de Oxígeno (ODDD) de HIF- $\alpha$  se hidroxilan, determinando su posterior degradación en el proteasoma de 26S.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que el homólogo funcional de HIF- $\alpha$  en *Drosophila*, Sima, se encuentra regulado por niveles de oxígeno a nivel post-traducciona, acumulándose la proteína en embriones sujetos a hipoxia (Lavista-Llanos et al., 2002). En experimentos en los que se comparó la reducción de la cantidad de la proteína en función de la concentración de oxígeno, en ensayos de sobre-expresión transiente de Sima en embriones se pudo demostrar que este control ocurre a nivel de degradación proteica (Lavista-Llanos et al., 2002).

Las proteínas HIF- $\alpha$  y Sima presentan una distribución similar de dominios (**Figura 18**) y una alta identidad a nivel de aminoácidos. Por lo tanto, nuestro primer objetivo fue identificar al dominio responsable de la degradación de Sima en normoxia, como así también los residuos de prolina dentro del mismo que son necesarios para dicho proceso.



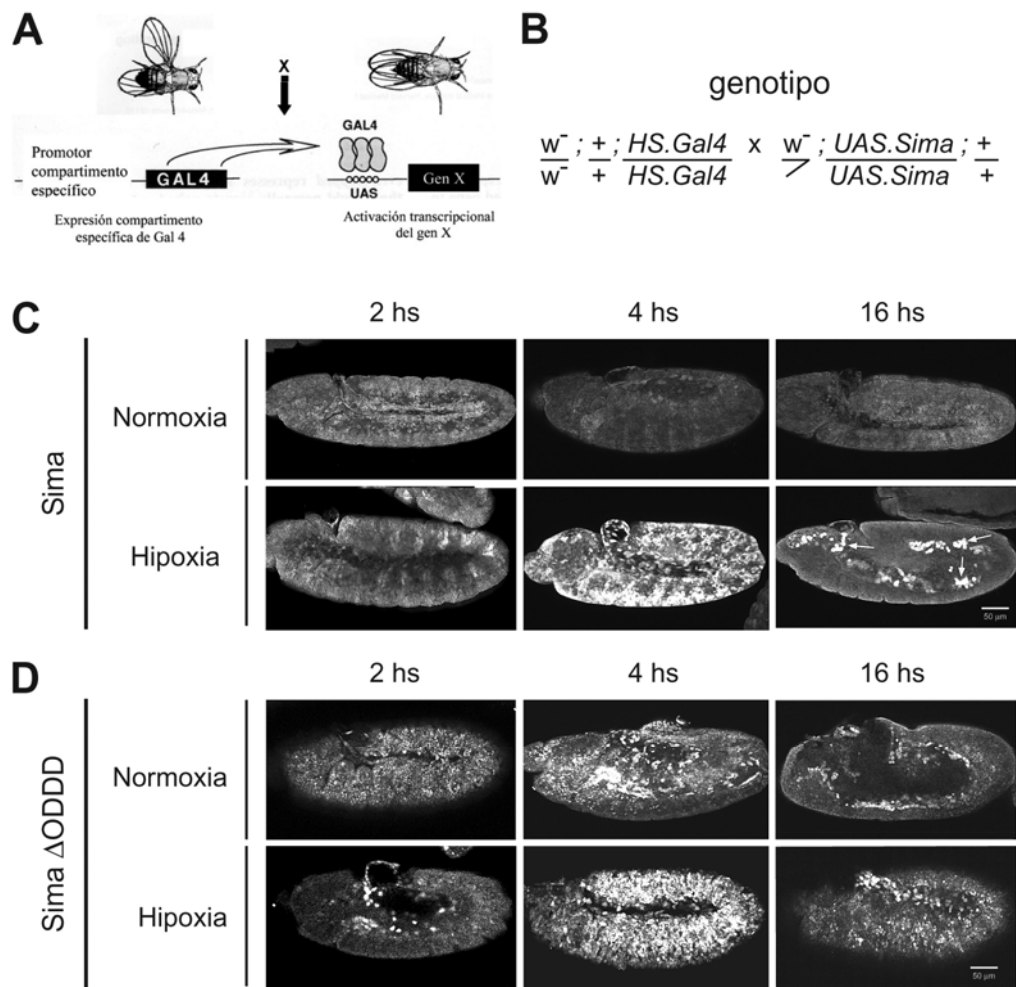
**Figura 18.** Representación esquemática de las proteínas HIF-1 $\alpha$  de mamíferos y Sima de *Drosophila*.

Las dos proteínas pertenecen a la familia de factores de transcripción basic helix-loop-helix PAS (**bHLH-PAS**). En el esquema se indican los dominios relevantes. El dominio bHLH (**amarillo**) se compone de una secuencia de aminoácidos básicos (**b**) que permite la unión al ADN y el motivo helix-loop-helix (**HLH**) media la interacción proteína/proteína con HIF-1 $\beta$ /Tango. Un segundo dominio de interacción proteína/proteína es el llamado **PAS (rosado)**. El dominio de degradación dependiente de oxígeno (**ODDD (rojo)**) media la degradación de HIF-1 $\alpha$ /Sima en presencia de oxígeno. Dentro del ODDD están indicados los residuos de prolina sujetos a hidroxilación dependiente de oxígeno en HIF-1 $\alpha$  y los posibles residuos homólogos en Sima. La secuencia de localización nuclear (**NLS**) funcional en HIF-1 $\alpha$  y las posibles NLSs de Sima están marcadas en azul.

### 1.a.) Identificación del dominio de degradación dependiente de oxígeno de Sima.

Se sobre-expresaron diferentes formas de Sima en embriones mediante el sistema *Gal4/UAS* de levaduras (Brand and Perrimon, 1993), en el que se utilizaron promotores específicos para la expresión del activador transcripcional GAL4 en patrones de expresión célula- o tejido-específico

en embriones, larvas, pupas o adultos. La proteína Gal4 y el gen blanco están inicialmente separados en dos líneas de moscas transgénicas diferentes, lo que asegura la viabilidad de las mismas (Figura 19A). El factor de transcripción se encuentra presente en una de las líneas, la cual carece de secuencias UAS a las que puede activar. En una segunda línea transgénica, el gen blanco se encuentra silenciado en ausencia de la proteína activadora Gal4. El gen blanco se transcribirá únicamente en la progenie del cruzamiento de la línea Gal4 con la línea UAS, permitiendo el estudio de fenotipos dominantes. De este modo, es posible subclonar el gen de interés río abajo de la secuencia UAS y activarlo únicamente en las células que expresan Gal4, observando el efecto de la expresión ectópica en dichas células.



**Figura 19.** Esquema experimental para evaluar la estabilidad proteica de Sima en función de los niveles de oxígeno.

(A) Sistema de expresión dirigida Gal4/UAS. Una línea transgénica lleva una construcción que expresa el factor de transcripción de levaduras Gal4 bajo la regulación de un promotor específico. Una segunda línea transgénica lleva el gen de interés clonado río abajo de la secuencia regulatoria UAS, reconocida por Gal4. El cruzamiento de ambas líneas genera individuos con las dos construcciones. (B) Esquema de cruzamientos para la expresión ectópica de Sima bajo el control de un promotor de heat shock (*hs*, inducible por calor) usando el sistema Gal4/UAS de levaduras. (C-D) Los embriones fueron incubados a distintos tiempos, luego de un pulso de calor de 20 minutos, en normoxia o en hipoxia (5% de oxígeno), para luego detectar a Sima por inmunofluorescencia utilizando un antisuero específico. (C) Para Sima WT, se observaron niveles moderados de la proteína



2 horas luego del pulso de calor, sin mostrar cambios entre normoxia e hipoxia. A las 4 y 16 horas luego del pulso de calor, Sima no pudo ser detectada en normoxia, pero sí en hipoxia. Nótese que 16 horas luego del pulso de calor en los embriones mantenidos en hipoxia se observan todavía algunos grupos de células positivas para Sima (**flechas**). **(D)** La delección de la región comprendida entre los aminoácidos 692 y 863 de Sima (**Sima $\Delta$ ODDD**) generó una proteína estable. A todos los tiempos analizados, luego del pulso de calor, esta forma delecionada de Sima pudo ser detectada a niveles similares en normoxia y en hipoxia.

En nuestros experimentos, líneas transgénicas expresando el factor de transcripción *Gal4* bajo un promotor inducible por calor (“Heat Shock”; **hs**) fueron cruzadas con líneas donde Sima o formas modificadas de Sima se expresan bajo el control del promotor UAS (**Figura 19B**). Por lo tanto, embriones *hs.Gal4/UAS.sima* fueron expuestos a un pulso de calor de 37°C durante 20 minutos, luego de lo cual analizamos la abundancia de la proteína Sima remanente a distintos tiempos tanto en normoxia como en hipoxia. Sima fue visualizada por inmunofluorescencia utilizando un antisuero específico generado en ratas<sup>1</sup>. Cuando se expresó la proteína Sima completa (Sima WT), dos horas luego del pulso de calor, no se pudieron observar diferencias entre la abundancia de la proteína en normoxia y en hipoxia (**Figura 19C**). En cambio, cuatro horas después del pulso de calor los embriones incubados en hipoxia mostraron niveles de Sima mucho más altos que los embriones mantenidos en normoxia. Dieciséis horas después del pulso de calor la presencia de Sima aún se observó en grupos de células en los embriones expuestos a hipoxia, resultando indetectable en los embriones mantenidos en normoxia (**Figura 19C**).

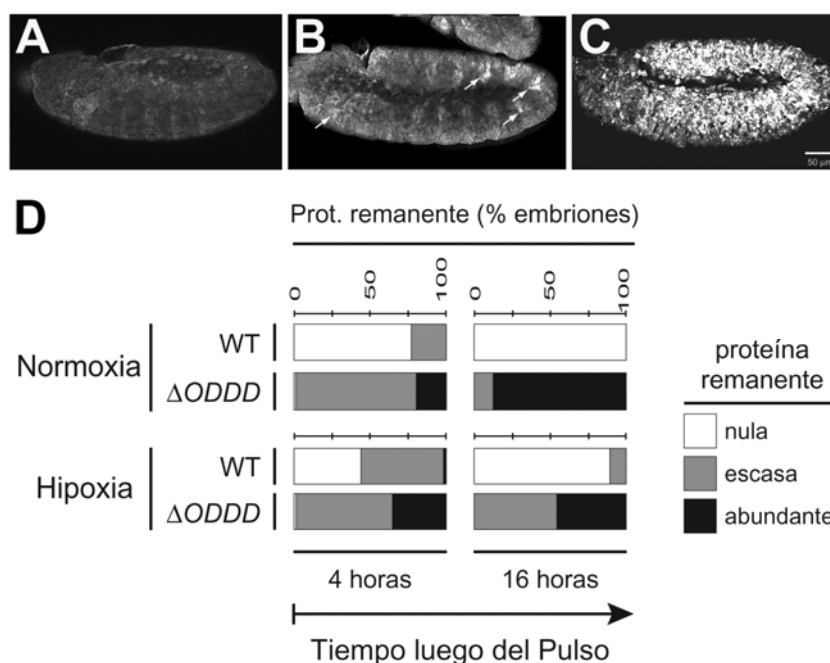
Basándonos en similitudes de secuencias, pudimos identificar un dominio central de Sima de 200 aminoácidos, aparentemente homólogo al ODDD del HIF- $\alpha$  de mamíferos (**Figura 18**). Realizamos una delección entre los aminoácidos 692 y 863 (**Sima $\Delta$ ODDD**) y expresamos la proteína en líneas transgénicas usando el sistema *hs.Gal4/UAS*, como se describió en el experimento anterior. Como se muestra en la **Figura 19D**, la delección estabilizó a Sima en normoxia, sin cambios en la abundancia cuando los embriones fueron incubados en hipoxia. Este resultado sugiere que la región comprendida entre los aminoácidos 692 y 863 de Sima correspondería al dominio ODDD, el cual sería responsable de la degradación de Sima de manera dependiente de los niveles de oxígeno.

A fin de cuantificar estas observaciones, definimos tres categorías de embriones según la abundancia de la proteína Sima juzgado a partir de estos experimentos de inmunofluorescencia:

- 1) Embriones donde no fue posible visualizar proteína remanente luego del pulso de calor (**Figura 20A**).
- 2) Embriones que mostraron una pequeña cantidad de proteína remanente (**Figura 20B**).
- 3) Embriones que presentaron gran cantidad de proteína remanente (**Figura 20C**).

---

<sup>1</sup> Para el resto de la tesis, cuando se haga referencia a la utilización de la técnica de inmunofluorescencia para detectar a Sima estaremos haciendo alusión a dicho antisuero.



**Figura 20.** Análisis semi-cuantitativo de la estabilidad proteica de Sima.

(A-C) Definimos tres categorías en función de la cantidad de Sima remanente, evaluada por inmunofluorescencia, luego de la inducción mediada por un pulso de calor. (A) Embriones donde no se pudo observar proteína remanente (categoría “nula”). (B) Embriones que mostraron una pequeña cantidad de Sima remanente (*flechas*), categoría “escasa”. (C) Embriones con mucha proteína remanente (categoría “abundante”). (D) Distribución de los embriones expresando Sima WT o Sima $\Delta$ ODDD clasificados en cada una de las tres categorías descriptas (A-C). Los embriones fueron mantenidos durante el tiempo indicado luego del pulso de calor en normoxia o en hipoxia (5% de oxígeno). La delección del ODDD provoca que la cantidad de proteína remanente sea mayor que en el caso de Sima completa, tanto en normoxia como en hipoxia, mostrando que la degradación de Sima en normoxia depende de este dominio.

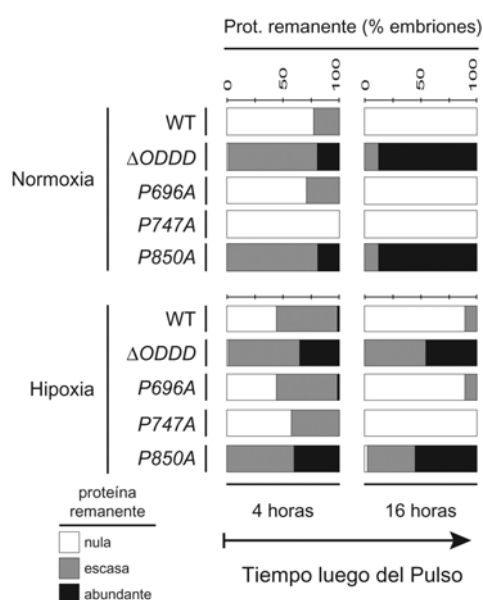
Comparamos la cantidad de proteína remanente para Sima WT y Sima $\Delta$ ODDD a diferentes porcentajes de oxígeno y observamos claramente que la delección del ODDD tiende a estabilizar la proteína tanto en normoxia como en hipoxia (**Figura 20D**). Si bien este ensayo de estabilidad es semi-cuantitativo y presenta baja sensibilidad, la gran diferencia en la cantidad de proteína remanente observada entre Sima completa y Sima $\Delta$ ODDD sugiere fuertemente que la región comprendida entre los aminoácidos 692 y 863 es clave para la regulación de la estabilidad dependiente de oxígeno de la proteína y que dentro del mismo probablemente se encuentran los residuos de prolina que se hidroxilan en normoxia.

Nuestro siguiente objetivo fue identificar los residuos de prolina dentro del ODDD necesarios para la regulación de la estabilidad proteica de Sima.

### 1.b.) Identificación de los Residuos de Prolina que controlan la estabilidad de Sima.

En HIF- $\alpha$  se han identificado dos residuos de prolina dentro del ODDD (P402 y P564), los cuales son hidroxilados sólo en normoxia, determinando la posterior degradación de HIF- $\alpha$  en el proteasoma de 26S (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Identificamos dentro del ODDD de Sima a tres residuos de prolina (P696, P747 y P850) que, por homología en sus secuencias flanqueantes con las prolinas claves de HIF- $\alpha$ , eran candidatos a ser hidroxilados.

Con el objeto de evaluar en líneas transgénicas si alguna de estas prolinas contribuye a la degradación de Sima en normoxia, decidimos reemplazar individualmente a cada uno de ellos por residuos de alanina, mediante mutagénesis sitio dirigida. Una vez obtenidas, dichas mutantes fueron clonadas río abajo del promotor UAS, para luego generar líneas transgénicas con cada una de ellas y analizar la estabilidad de las proteínas mutadas como en el experimento anterior. En los tiempos estudiados, 4 y 16 horas después del pulso de calor, pudimos observar que solamente la mutante P850/A presentó un importante aumento en la estabilidad proteica con respecto a Sima WT, presentando un comportamiento similar al de Sima $\Delta$ ODDD. Interesantemente, SimaP850A tampoco presentó diferencias en cantidad de proteína entre normoxia e hipoxia (**Figura 21**). Las formas mutagenizadas P696/A y P747/A presentaron una estabilidad similar a la observada en la proteína WT tanto en normoxia como en hipoxia (**Figura 21**). Estos resultados sugieren que en *Drosophila* solamente la prolina 850 sería necesaria para la regulación dependiente de oxígeno de la estabilidad proteica de Sima.



**Figura 21.** Rol de la prolina 850 en la estabilidad proteica de Sima.

Se comparó la cantidad de Sima remanente luego de expresar mediante un pulso de calor la proteína WT o formas mutadas de la misma en normoxia o en hipoxia (5% de oxígeno). Los embriones fueron clasificados en las tres categorías, descritas en la figura anterior, en función de la cantidad de proteína remanente. La estabilidad de SimaP696A y SimaP747A fue similar a la de Sima WT, tanto en normoxia como en hipoxia. En cambio, SimaP850A fue mucho más estable que sima WT, asemejándose al comportamiento de Sima $\Delta$ ODDD. La cantidad remanente de SimaP850A no varió en función de los niveles de oxígeno, sugiriendo que la degradación de Sima en normoxia depende de la prolina 850.

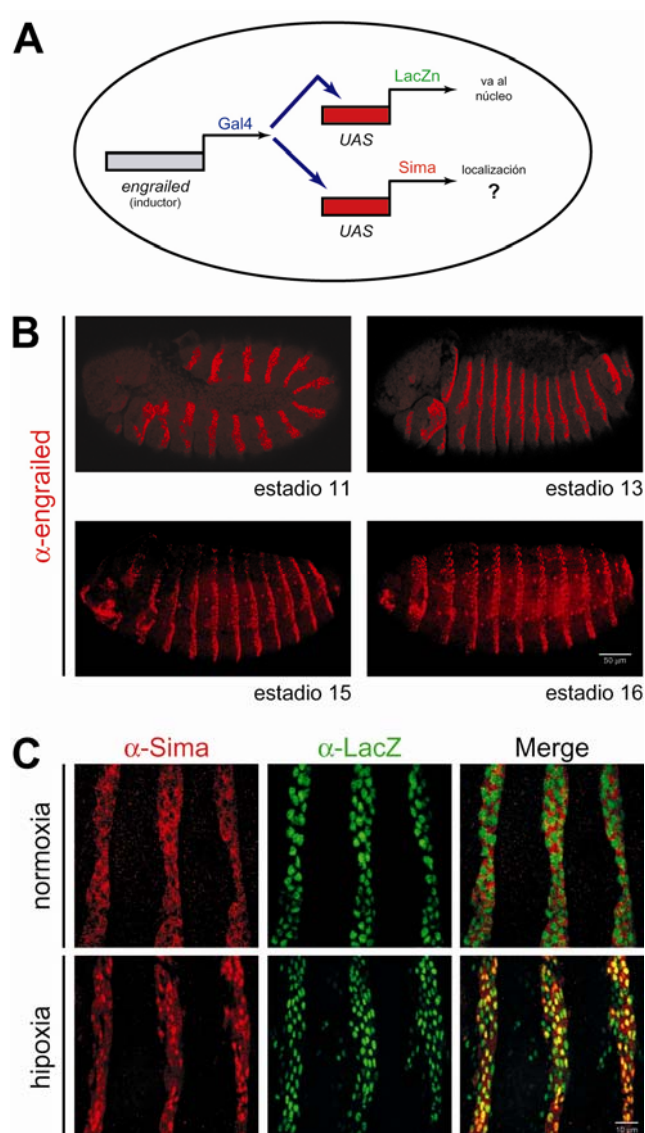
Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que Sima está regulada a nivel de su estabilidad proteica de manera dependiente de los niveles de oxígeno, y que la prolina 850 dentro del ODDD

es necesaria para dicha regulación. Este mecanismo de control de la vida media de Sima sería por lo tanto similar al de la proteína HIF- $\alpha$  de mamíferos.

## 2. Regulación de la Localización Subcelular de Sima.

### 2.a.) Estrategia Experimental.

Sima se degrada rápidamente en normoxia, por lo que la proteína endógena no puede ser detectada en dicha condición. Con el objeto de estudiar la regulación de la localización subcelular dependiente de O<sub>2</sub>, la Dra. Lavista-Llanos puso a punto un método en el que utilizó el sistema *Gal4/UAS* de levadura para sobre-expresarse a Sima en embriones de *Drosophila* de manera de sobrepasar su rápida degradación proteica, permitiendo de esta manera su visualización por inmunofluorescencia (Lavista-Llanos et al., 2002)(Figura 22A)<sup>2</sup>.



**Figura 22.** Estrategia experimental para estudiar la localización subcelular de Sima en embriones de *Drosophila*.

(A) Sistema de expresión Gal4/UAS. Sima se expresa ectópicamente en embriones transgénicos bajo el control del inductor *engrailed.Gal4*. Un segundo transgen, *UAS.LacZn* (donde la proteína LacZ lleva una señal de localización nuclear), es utilizado para identificar los núcleos. (B) Patrón de expresión del gen *engrailed* durante la embriogénesis. Engrailed, factor de transcripción con localización exclusivamente nuclear, se expresa en 14 bandas transversales en el eje antero-posterior del embrión. Se muestra el patrón de expresión de *engrailed* en cuatro estadios representativos de la embriogénesis. La proteína se detecta por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico. (C) Regulación de la localización subcelular de Sima por oxígeno. Sima fue expresada ectópicamente utilizando el inductor *en.Gal4*, superando de esta manera su rápida velocidad de degradación en normoxia, lo que permite su visualización por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico anti-Sima. Los embriones también contenían el transgen *UAS.LacZn* visualizado con un anticuerpo anti- $\beta$ -Gal, que permite marcar los núcleos. En normoxia, Sima se localiza mayormente en el citoplasma y en hipoxia (5% de oxígeno por 4 horas) se localiza principalmente en el núcleo.

<sup>2</sup> En adelante cuando se hable de Sima sobre-expresada en ensayos de localización subcelular se hará alusión a la sobre-expresión mediante el sistema *Gal4/UAS* utilizando como inductor al promotor del gen *engrailed*.

El patrón de sobre-expresión de Sima depende del promotor que se utiliza en la línea Gal4 inductora; en este estudio se utilizó el promotor del gen *engrailed* (**Figura 22A**), gen que se expresa en catorce bandas transversales a lo largo del eje antero-posterior del embrión, durante toda la embriogénesis (**Figura 22B**). Para visualizar los núcleos, en estos ensayos sobre-expresamos junto a Sima otro transgen que codifica la proteína LacZ fusionada a una secuencia de localización nuclear (*LacZn*) (**Figura 22A**). Sima sobre-expresada dentro de las 14 bandas de *engrailed* resultó ser mayormente citoplasmática en normoxia y principalmente nuclear en hipoxia, a juzgar por la co-localización con el marcador nuclear LacZn (**Figura 22C**) (Lavista-Llanos et al., 2002). Estudios previos llevados a cabo por la Dra. Lavista-Llanos habían determinado que las cantidades de proteína total en normoxia y en hipoxia es semejantes, indicando que la sobre-expresión contrarrestó el efecto del oxígeno sobre la degradación de Sima.

## **2.b.) La localización subcelular de Sima depende de los niveles de oxígeno y del estadio embrionario.**

Para el estudio de la localización subcelular de Sima seleccionamos cuatro etapas de la embriogénesis en las que se expresa *engrailed*: los estadios 11-12, 13-14, 15 y 16 (**Figura 22B**). Si bien al sobre-expresar a Sima en embriones en normoxia se observó que la proteína es mayormente citoplasmática (**Figura 22C**), notamos que la regulación de la localización subcelular de Sima no es un fenómeno que funciona a “todo o nada”. Para llevar a cabo estudios cuantitativos, definimos tres categorías arbitrarias de distribución subcelular de Sima en los embriones:

**Citoplasmática:** donde Sima está excluida del núcleo en más del 90% de las células del embrión que expresan la proteína,

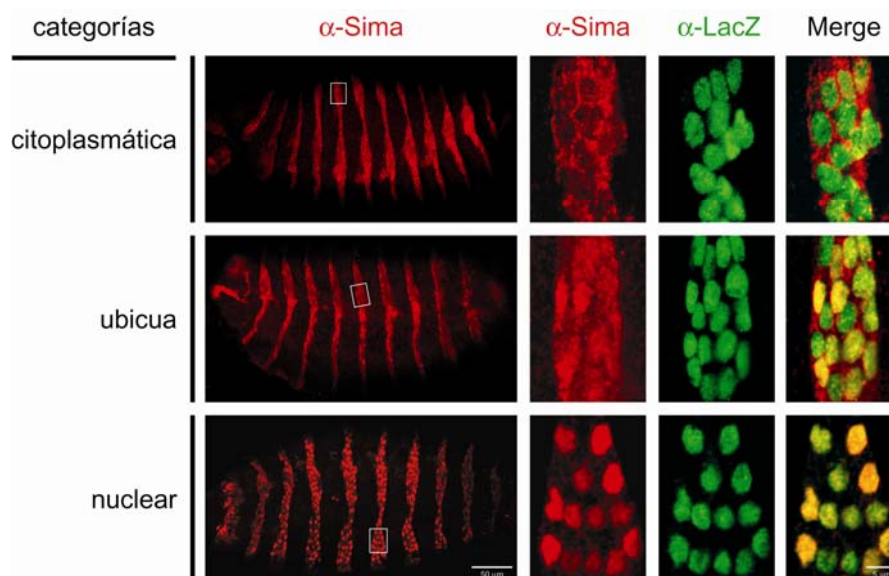
**Nuclear:** donde la proteína se localiza en el núcleo en más del 90% de dichas células,

**Ubicua:** donde ninguna de las dos categorías anteriores llegó al 90%.

En la **Figura 23** se muestran embriones representativos de cada una de estas tres categorías.

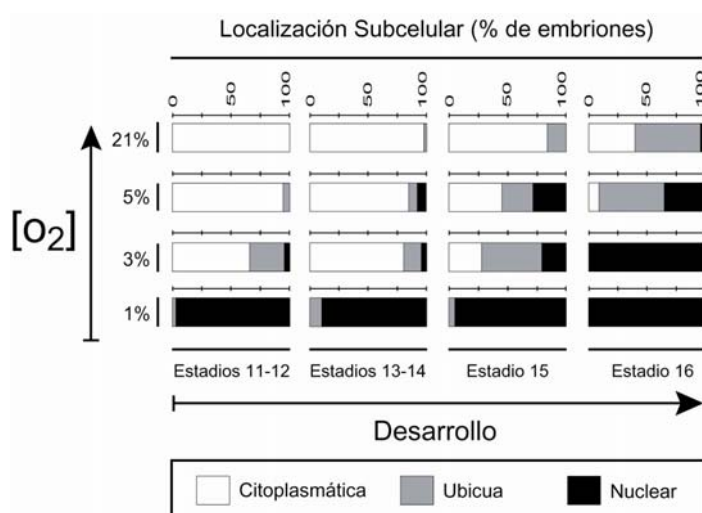
En los experimentos que se describen a continuación, cada embrión fue clasificado dentro de una de estas tres categorías de localización subcelular de Sima, y se contaron como mínimo 40 embriones de cada condición de concentración de oxígeno, en cada uno de los estadios embrionarios analizados (Dekanty et al., 2005).

En la **Figura 24** se ilustra la distribución de Sima a lo largo de la embriogénesis, a diferentes niveles de oxígeno. En los estadios 11-12 y 13-14 en normoxia (O<sub>2</sub> 21%) la mayoría de los embriones mostraron a Sima localizada en el citoplasma. Sin embargo en el estadio 15 en normoxia, el 20% de los embriones mostró una localización de Sima categorizada como ubicua y en el estadio 16, la proporción de embriones en normoxia con localización ubicua llegó al 50% e interesantemente, el 4% de los embriones de estadio 16 mostraron localización nuclear de Sima.



**Figura 23.** Definición de tres categorías de localización subcelular de Sima. Las proteínas Sima y LacZn fueron expresadas simultáneamente en embriones transgénicos bajo el control del inductor *en.Gal4*. Los embriones fueron fijados y sujetos a doble inmunofluorescencia: anti-Sima (rojo) y anti- $\beta$ -Gal (verde). En función de la localización subcelular de Sima, definimos tres categorías arbitrarias: “Citoplasmática”, “Ubigua” y “Nuclear”. En el primer panel de cada categoría se muestra una región amplificada (recuadro blanco) para visualizar la localización subcelular de Sima.

Concluimos por lo tanto, que existen diferencias en la localización subcelular de Sima a lo largo del desarrollo en normoxia (análisis estadístico en el **Apéndice 1**), tendiendo a incrementarse progresivamente la localización nuclear en estadios más avanzados del desarrollo. Luego, analizamos si la localización subcelular de Sima depende del grado de hipoxia y para ello realizamos el mismo estudio pero a diferentes niveles de oxígeno a lo largo del desarrollo (**Figura 24**).



**Figura 24.** Localización subcelular de Sima en función de los niveles de oxígeno a lo largo del desarrollo.

Placas conteniendo embriones fueron incubadas a diferentes concentraciones de oxígeno durante 4 horas y los embriones fueron luego fijados para inmunofluorescencia. En normoxia, Sima fue exclusivamente citoplasmática en los estadios 11-12, mientras que conforme avanza la embriogénesis, Sima se tornó progresivamente más nuclear. Conforme decrece la concentración de oxígeno, Sima también es progresivamente más nuclear.

Sima fue gradualmente más nuclear a medida que disminuían los niveles de oxígeno y esto pudo verificarse en todos los estadios del desarrollo analizados. Confirmando la modulación de la localización subcelular por el desarrollo, pudo observarse que en los estadios 11-12 la proteína tiende a ser más citoplasmática y a medida que progresa la embriogénesis se torna cada vez más nuclear (análisis estadístico en el **Apéndice 1**). Estos resultados muestran que la localización subcelular de Sima depende de los niveles de oxígeno y que dicha regulación está modulada por parámetros del desarrollo.

### **2.c.) Sima presenta un movimiento continuo entre el núcleo y el citoplasma y su exportación nuclear está mediada por CRM1/Embargoed.**

En la literatura hay cada vez más ejemplos en los que proteínas cuya localización subcelular depende de estímulos externos presentan un movimiento continuo entre el núcleo y el citoplasma. En dichos casos, la presencia del estímulo externo altera el balance entre la velocidad de importación y la velocidad de exportación, provocando un cambio en la proporción de proteína localizada en uno u otro compartimiento (Fabbro and Henderson, 2003; Reguly and Wrana, 2003; Swameye et al., 2003).

Resultados preliminares del laboratorio sugieren que la proteína Sima es uno de estos casos, siendo continuamente importada al núcleo y re-exportada al citoplasma (Lavista-Llanos 2005, Tesis Doctoral). Sin embargo, dado que los mecanismos de importación y exportación nuclear no han sido caracterizados, decidimos estudiar cómo se regula este proceso. Debido a que Sima es una proteína de alto peso molecular, tanto su importación al núcleo como la exportación al citoplasma deberían estar mediadas respectivamente por señales de localización nuclear (NLS) y de exportación (NES). Decidimos por lo tanto identificar dichas señales necesarias para la regulación de la localización subcelular de Sima.

#### ***2.c.1) Identificación de una señal de localización nuclear funcional en la secuencia de Sima.***

En función de su estructura, las señales de localización subcelular (NLSs) se clasifican en tres categorías:

a) Señales **Monopartitas**: están constituidas por 4 aminoácidos básicos (residuos de lisina o arginina) o tres aa básicos y un cuarto aa que puede ser un residuo de histidina o de prolina. La NLS monopartita más ampliamente estudiada ha sido la del Antígeno T grande del virus SV40 (SV40 large T antigen) (Hicks and Raikhel, 1995).

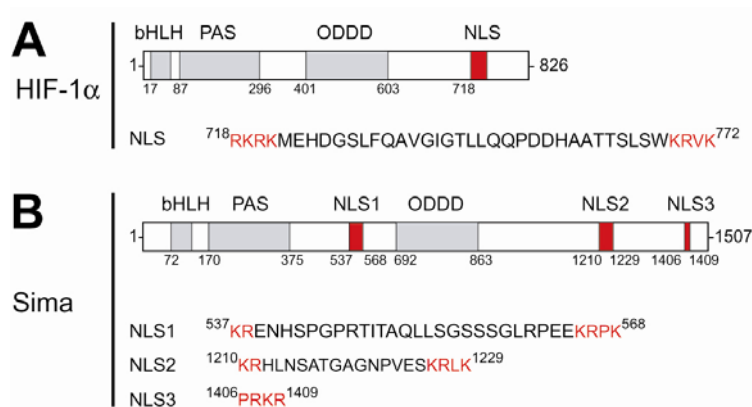
b) Señales **Bipartitas**: encontradas inicialmente en la Nucleoplasmina de *Xenopus*, consistente en dos aminoácidos básicos, un espacio de 10 aa y una segunda región básica

que contiene al menos 3 residuos básicos en un grupo de 5 aminoácidos en total (Robbins et al., 1991).

c) Un tercer tipo de señales constituye un grupo heterogéneo que ha sido muy poco estudiado, y por lo tanto este tipo de señales no son reconocidas por los programas que reconocen NLSs. Un ejemplo de ellas lo constituye la proteína alfa Mat de levaduras (Hicks and Raikhel, 1995).

En la proteína HIF- $\alpha$  de mamíferos se ha encontrado en la región carboxi terminal una NLS funcional (aa 718 y 722) que fue inicialmente descrita como una señal de tipo monopartita (Kallio et al., 1998). Estudios posteriores demostraron que en realidad la secuencia descrita formaba parte de una NLS bipartita no canónica, con una separación de 27 aminoácidos entre las dos regiones básicas en lugar de la separación habitual de 10 aa (Luo and Shibuya, 2001)(Figura 25A).

Utilizamos el programa PSORT para identificar NLSs en la secuencia aminoacídica de Sima y encontramos solamente una NLS, del tipo monopartita, la cual se localiza en el extremo C-terminal de la proteína (aa 1406 y 1409) (NLS3 en la Figura 25B). Sin embargo, al inspeccionar la secuencia de Sima con mayor detenimiento, comparándola con la NLS de la subunidad alfa de HIF, localizamos además dos posibles NLSs bipartitas atípicas: la primera localizada entre los residuos, 537 y 568, y la segunda entre los aa 1210 y 1229 (NLS1 y NLS2, respectivamente, en la Figura 25B). Estas NLSs bipartitas no canónicas estarían compuestas por dos regiones ricas en residuos básicos cuya separación es de 26 y 14 residuos, respectivamente, a diferencia de los 10 residuos de separación que caracterizan a las NLSs bipartitas canónicas. Estas tres posibles NLSs en la secuencia de Sima están indicadas respectivamente como NLS1, NLS2 y NLS3 en la Figura 25B.



**Figura 25.** Señales de localización nuclear (NLSs) predichas en las proteínas HIF-1 $\alpha$  de mamíferos y Sima de *Drosophila*.

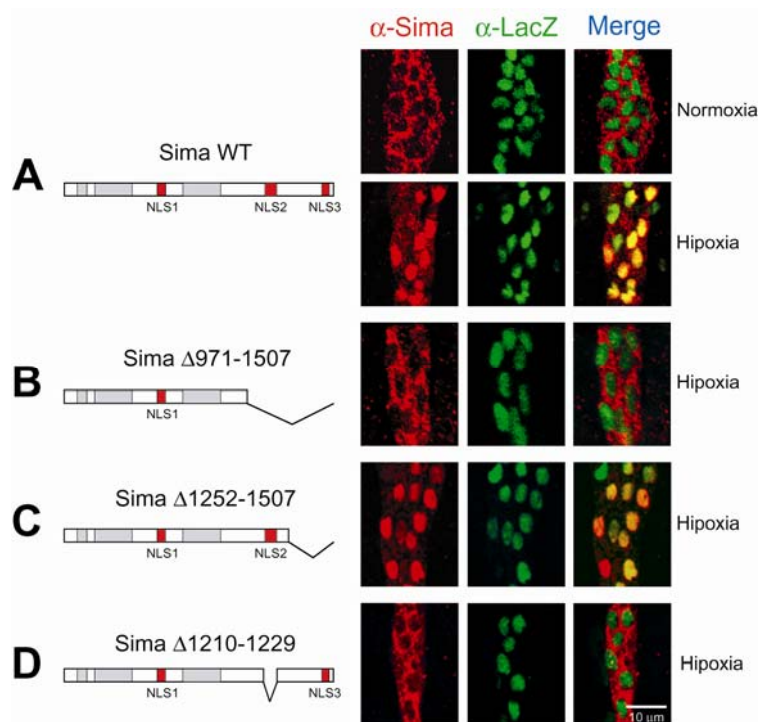
(A) Representación esquemática de HIF-1 $\alpha$ . La NLS funcional en su extremo C-terminal está indicada en rojo. La señal de localización nuclear tiene una estructura bipartita atípica, en la cual la separación entre las regiones básicas (aminoácidos en

en rojo) es de 31 residuos. (B) Representación esquemática de Sima. Las NLSs candidatas (i.e. NLS1, NLS2 y NLS3) están indicadas en rojo. La NLS1 (aa 537-568) y NLS2 (aa 1210-1229) tienen una estructura de posible NLS bipartita atípica, con una separación entre las regiones básicas (aminoácidos en rojo) mayor a 10 residuos. NLS3 (aa 1406-1409) presenta el típico consenso de las señales monopartitas.

Con el fin de determinar si alguna de estas NLSs son funcionales, decidimos generar deleciones de Sima que afecten a cada una de las putativas NLSs y clonar estas formas delecionadas de Sima



bajo el control del promotor *UAS* de levaduras, para luego obtener líneas transgénicas y evaluar la localización subcelular en embriones (**Figura 26**). Como se describió en la sección anterior, la sobre-expresión de la forma nativa de Sima en embriones presentó una localización principalmente citoplasmática en normoxia, mientras que en una atmósfera con 5% de oxígeno fue mayormente nuclear (**Figura 22C y 26A**). La sobre-expresión de una forma delecionada de Sima en el extremo C-terminal (a partir del aa 971, incluyendo a NLS2 y NLS3) presentó una localización totalmente citoplasmática aún en 5% de oxígeno (**Figura 26B**). Este resultado permitió descartar a la NLS1 como una señal suficiente para el ingreso de Sima al núcleo. Nos concentramos entonces sobre NLS2 y NLS3, para lo cual generamos una deleción menor que abarca desde el residuo 1252 hasta el 1507, conteniendo solamente la NLS3. Al expresar esta proteína truncada en embriones transgénicos, encontramos que se comportó exactamente como la proteína salvaje, siendo nuclear a  $O_2$  5% (**Figura 26C**) y citoplasmática en normoxia (no mostrado). Esto nos permitió descartar a la NLS3 como una señal de localización subcelular funcional, sugiriendo que la NLS2 media la importación nuclear de Sima. Decidimos por lo tanto, realizar una deleción específica de la NLS2, eliminando la secuencia comprendida entre los aa 1210 y 1229. Esta proteína delecionada presentó una localización totalmente citoplasmática incluso en condiciones severas de hipoxia (**Figura 26D**). A partir de estos resultados, concluimos que la NLS2 dirige la importación de Sima al núcleo. Decidimos a continuación caracterizar la NLS2 de manera más detallada.



**Figura 26.** Identificación de la señal de localización nuclear funcional de Sima.

Localización subcelular de Sima completa (**A**) o de formas delecionadas de Sima (**B-D**). Las construcciones de Sima fueron expresadas en embriones transgénicos bajo el control del inductor *en.Gal4* y la localización subcelular fue analizada con un anticuerpo específico anti-Sima (rojo), tomando como referencia al marcador LacZn co-expresado por los embriones (anti-β-Gal; verde). En la fotografía se muestran algunas de las células de una de las bandas de expresión de *engrailed*. (**A**) Sima completa fue predominantemente citoplasmática en normoxia y principalmente nuclear en hipoxia (5% de oxígeno). (**B**) La

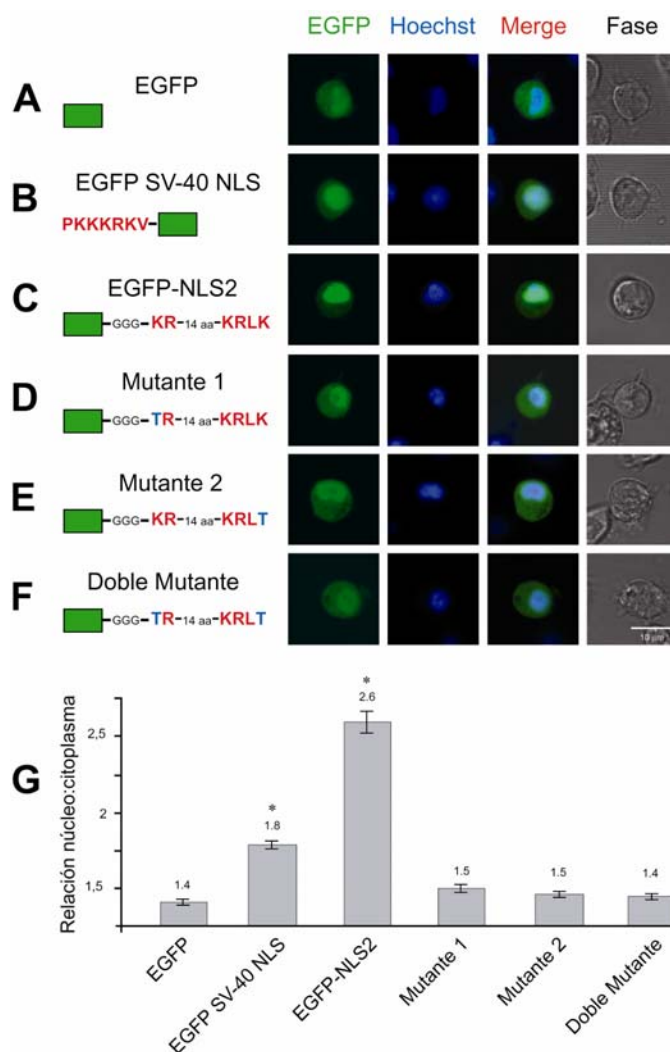
forma delecionada entre los residuos 971 y 1507, carente de las señales candidatas NLS2 y NLS3, no ingresó al núcleo en hipoxia, detectándose solamente en el citoplasma. (**C**) Sima $\Delta$ 1252-1507, carente de la NLS3, mostró un comportamiento similar al de Sima completa, localizándose en el núcleo en hipoxia. (**D**) Sima $\Delta$ 1210-1229 fue totalmente citoplasmática aún en hipoxia, indicando que la NLS2 sería la señal de localización nuclear funcional de Sima.

### 2.c.2) Caracterización de la señal de localización nuclear de Sima.

Con el objeto de caracterizar a la NLS2 de Sima fusionamos el péptido 1210-1229 a EGFP, para luego transfectar esta quimera en células S2 de *Drosophila* y estudiar cuantitativamente su localización subcelular por microscopía Confocal (Carl Zeiss LSM5, Pascal). Se definió un área similar en el núcleo y en el citoplasma, se midió la intensidad media de la fluorescencia de EGFP en cada uno de los dos compartimentos y se calculó luego la relación de intensidad de la fluorescencia entre ambos compartimentos (“Relación núcleo:citoplasma”; N/C). Se cuantificó un número mínimo de 25 células para cada condición y se definió la significancia de los resultados mediante el test estadístico T-student.

En primer lugar fue necesario caracterizar la localización subcelular de EGFP en el sistema de células S2 y para identificar los núcleos utilizamos el reactivo de Hoechst. El bajo peso molecular de EGFP permite su libre difusión entre el núcleo y el citoplasma, pero a pesar de esto presentó una leve tendencia a localizarse en el núcleo (**Figura 27A**) con una relación N/C de 1,4. Como control positivo de nuestros experimentos fusionamos EGFP a una NLS previamente caracterizada -la señal monopartita del Antígeno T grande del virus SV40- (Hicks and Raikhel, 1995). La localización subcelular de EGFP-SV40-NLS fue más nuclear que la de EGFP (**Figura 27B**), siendo la relación N/C de 1,8 (**Figura 27G**). Nuestro siguiente paso fue definir si la región comprendida entre los residuos 1210-1229 de Sima era capaz de alterar la localización subcelular de EGFP de modo similar a la del control positivo. Sorprendentemente, la quimera presentó una localización aún más nuclear que la del control positivo (**Figura 27C**), con una relación N/C de 2,6 (**Figura 27G**), demostrando que el péptido 1210-1229 contiene una NLS fuerte. A continuación, analizamos si la NLS2 es una señal bipartita no canónica. Si este fuese el caso, las dos regiones básicas separadas por 14 residuos deberían ser necesarias para que la señal sea funcional. Para ello decidimos mutagenizar uno de los residuos básicos (lisina o arginina) en cada uno de los bloques putativos de la NLS2 o en ambos bloques simultáneamente. En las **Figura 27D-F** se muestran en azul los aminoácidos mutagenizados dentro de cada uno de los bloques de aminoácidos básicos. Para todas las formas mutadas de la NLS2, la localización subcelular fue similar a la de EGFP (**Figura 27D-G**), demostrando que ambas regiones básicas son necesarias para la funcionalidad de la NLS2.

Estos resultados en conjunto nos permiten proponer que NLS2 es una señal de localización nuclear funcional del tipo *bipartita no canónica* -con una separación de 14 aminoácidos- necesaria para la importación de Sima al núcleo. Habiendo caracterizado la señal de importación, el próximo paso fue estudiar las señales que median la exportación nuclear de Sima y la maquinaria celular involucrada en dicho proceso.



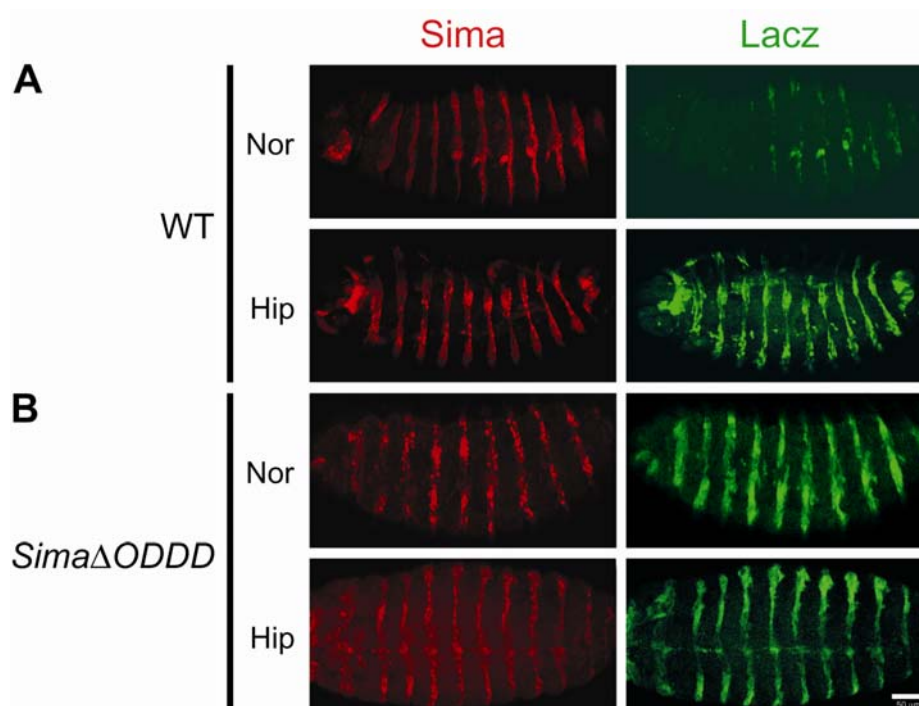
**Figura 27.** NLS2 es una señal bipartita atípica que puede dirigir la importación de EGFP al núcleo en células S2 de *Drosophila*.

Transfectamos diferentes construcciones de EGFP en células S2 de *Drosophila* (A-F), para luego analizar cuantitativamente la localización subcelular en el microscopio confocal. (G) Se midió la intensidad de fluorescencia en el núcleo y en el citoplasma de cada célula y se calculó la relación de intensidades entre ambos compartimentos (núcleo:citoplasma; N:C) para cada construcción. La relación N:C de cada construcción fue comparada con la de EGFP usando el test t-Student (\*,  $P < 10^{-14}$ ;  $N > 21$ ). Los núcleos fueron marcados con el reactivo de Hoechst. Tanto el control positivo EGFP-SV-40 NLS (B) como EGFP-NLS2 (C) mostraron una localización más nuclear que EGFP (G). La mutagénesis de un aminoácido (mostrado en azul) en cualquiera de las dos regiones básicas de la NLS2 (D,E), o en ambas regiones básicas simultáneamente (F), eliminan totalmente la actividad de la NLS2 (G), mostrando que la NLS2 es una señal bipartita atípica.

### 2.c.3) Señales de Exportación Nuclear localizadas en el ODDD de Sima.

Estudios realizados en HIF-1 $\alpha$  de mamíferos demostraron que la delección del ODDD causó tanto la estabilización de la proteína como un aumento en su actividad transcripcional (Elson et al., 2001). Decidimos a continuación evaluar si la delección del ODDD de Sima también genera un

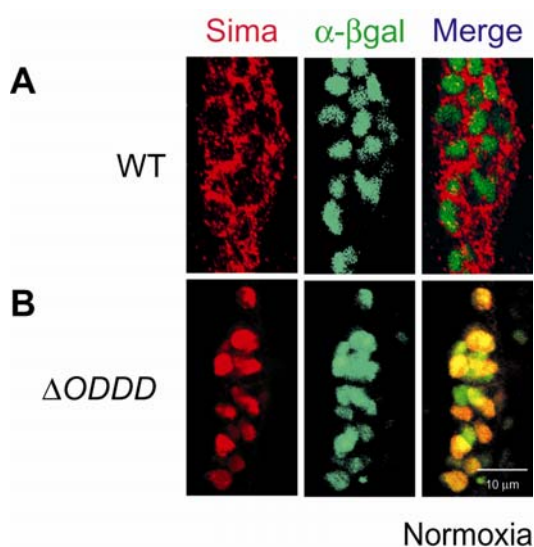
aumento en su actividad transcripcional. Para ello, contábamos en el laboratorio con líneas transgénicas que contienen un gen reportero sensible a oxígeno (Lavista-Llanos et al., 2002), el cual está formado por la secuencia enhancer del gen *lactato deshidrogenasa* murino (*mLDH*) controlando la expresión del gen bacteriano *lacZ* (*mLDH.LacZ*) (ver Introducción, **Figura 12B**). Recombinamos al gen reportero con el inductor *en.Gal4* (*en.Gal4/mLDH.LacZ*), para luego cruzar esta línea recombinada con la línea transgénica *UAS.sima* o *UAS.sima $\Delta$ ODDD*. De esta manera, todos los embriones que sobre-expresan Sima o Sima $\Delta$ ODDD contenían el gen reportero. Mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-Sima y anti-LacZ, comparamos la actividad transcripcional de Sima completa con la de Sima $\Delta$ ODDD, tanto en normoxia como en 5% de oxígeno (hipoxia) (**Figura 28**). La expresión ectópica de Sima provocó una leve inducción del reportero en normoxia, mientras que la incubación de estos embriones en una atmósfera con 5% de oxígeno provocó un sensible incremento en los niveles del reportero LacZ (**Figura 28A**). En cambio, la actividad transcripcional de Sima $\Delta$ ODDD fue similar en normoxia y en hipoxia, mostrando una fuerte inducción del gen reportero (**Figura 28B**).



**Figura 28.** Actividad transcripcional de Sima $\Delta$ ODDD.

Se expresó ectópicamente a Sima WT (**A**) y a una forma delecionada de Sima en el ODDD (Sima $\Delta$ ODDD) (**B**), usando como inductor a la línea recombinante *en.Gal4/mLDH.LacZ*. Mediante inmunofluorescencia se identificaron los embriones que sobre-expresaban las distintas formas de Sima (anticuerpo anti-Sima, **rojo**), para luego visualizar la actividad transcripcional de estas proteínas (anticuerpo anti- $\beta$ -Gal, **verde**). (**A**) La actividad transcripcional de Sima WT depende del oxígeno: en normoxia la inducción del gen reportero fue débil, observándose un fuerte incremento al pasar los embriones a una atmósfera con 5% de oxígeno (hipoxia). (**B**) En cambio, Sima $\Delta$ ODDD mostró una fuerte inducción del gen reportero de manera independiente de los niveles del oxígeno.

Dado que para que la proteína sea activa debe estar localizada en el núcleo, hipotetizamos que tal vez el ODDD no sólo controla la estabilidad proteica de Sima, sino además su localización subcelular. A fin de contrastar esta hipótesis, analizamos la localización subcelular de Sima $\Delta$ ODDD utilizando la estrategia de sobre-expresión descrita en la **Figura 22**. Tanto Sima completa como la forma delecionada en el ODDD fueron sobre-expresadas junto al transgen *UAS.GFPn-LacZ* (para visualizar los núcleos) utilizando el inductor *en.Gal4*. Como se describió más arriba (**Figura 22C**), la forma completa de Sima presentó una localización principalmente citoplasmática en normoxia (**Figura 29A**) y mayormente nuclear en hipoxia. Sima $\Delta$ ODDD se localizó constitutivamente en el núcleo, independientemente de los niveles de oxígeno (**Figura 29B**). Este resultado sugiere que el ODDD estaría involucrado no sólo en la degradación de Sima sino también en el control de su localización subcelular.



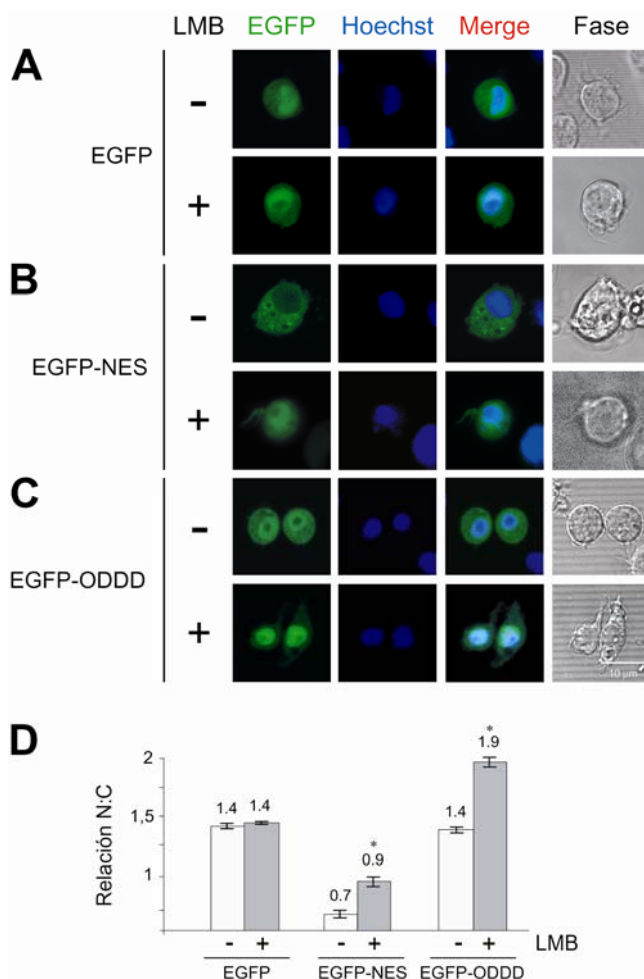
**Figura 29.** El dominio ODDD es necesario para la localización citoplasmática de Sima en normoxia. Localización subcelular de Sima completa (**A**) o delecionada entre los residuos 692 y 863 (**B**, Sima $\Delta$ ODDD). Las construcciones fueron expresadas en embriones transgénicos bajo el control del inductor *en.Gal4* y la localización subcelular fue analizada con un anticuerpo específico contra Sima (rojo). Los embriones co-expresaban también una forma de LacZ con localización nuclear (*LacZn*), permitiendo marcar los núcleos mediante un anticuerpo anti- $\beta$ -Gal (verde). En la fotografía se muestran algunas células de una de las bandas de expresión de *engrailed*. En normoxia (**A**) Sima completa fue predominantemente citoplasmática y (**B**) Sima $\Delta$ ODDD fue constitutivamente nuclear, sugiriendo que este dominio está involucrado en la regulación de la localización subcelular dependiente de oxígeno de Sima.

A partir de estos datos, planteamos la hipótesis de que tal vez la/las Señales de Exportación Nuclear (**NES**, “**N**uclear **E**xport **S**ignal”) de Sima podrían estar en el ODDD. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue definir si en el ODDD de Sima existe una señal de exportación nuclear. El mecanismo mejor caracterizado y más comúnmente utilizado por las proteínas de alto peso molecular para su transporte desde el núcleo al citoplasma está mediado por **NES** ricas en residuos hidrofóbicos que permiten su reconocimiento por el receptor de exportación nuclear exportina-1/CRM1 (Fornerod et al., 1997; Stade et al., 1997). En *Drosophila* el gen *embargoed* (*emb*) es el homólogo de CRM1 (Collier et al., 2000) y diferentes alelos mutantes para este gen han sido aislados, demostrándose que provocan la acumulación nuclear de diversas proteínas que normalmente tienen localización citoplasmática o ubicua (Collier et al., 2000; Spradling et al., 1995; Torok et al., 1993). Resultados preliminares obtenidos en el laboratorio por la Dra. Lavista-Llanos

sugieren que Sima es exportada del núcleo al citoplasma mediante un mecanismo que dependería de CRM1/Embargoed, pero esta posibilidad no había sido estudiada en profundidad.

#### 2.c.4) Identificación de la NES del ODDD mediante fusiones a EGFP.

Para determinar si en el ODDD de Sima existe realmente una NES dependiente de CRM1 decidimos hacer uso nuevamente del modelo de células S2. La ventaja de este sistema celular es que permite la intervención farmacológica con Leptomicina B (LMB), droga que inhibe específicamente al exportador nuclear CRM1/Embargoed (Kudo et al., 1998; Nishi et al., 1994). Como se describió más arriba, EGFP transfectada en células S2 presentó una localización subcelular con leve prevalencia nuclear (Figura 27A y 30A), exhibiendo una relación de distribución núcleo:citoplasma de 1,4 (Figura 30D). La localización de EGFP no fue afectada por el agregado de LMB (Figuras 30A y D), resultado esperable por la falta de una NES regulable por CRM1 en la secuencia de esta proteína.



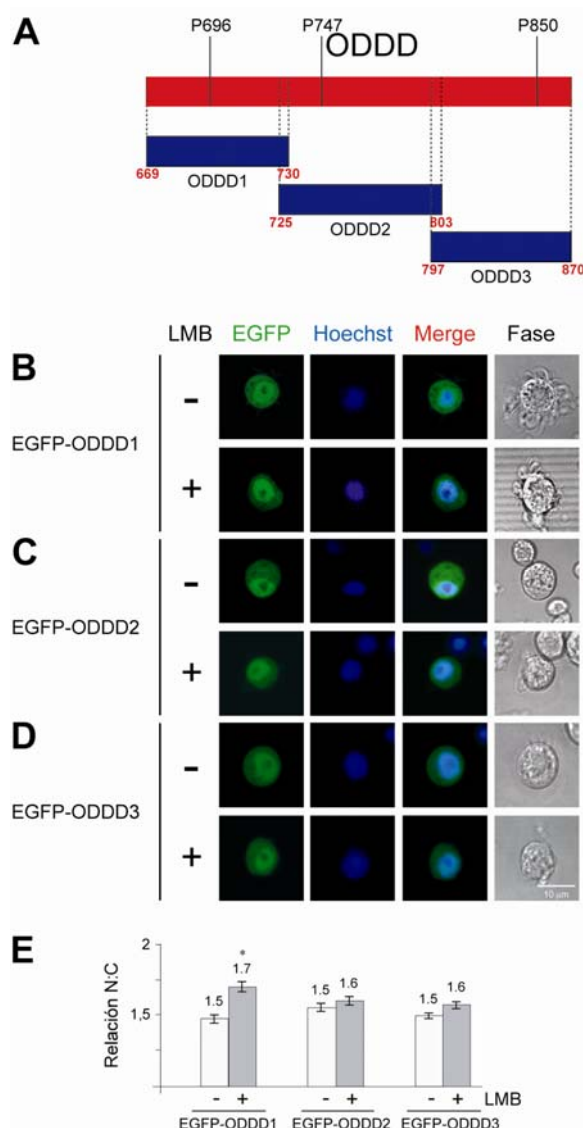
**Figura 30.** Existe una NES en el dominio de degradación dependiente de oxígeno de Sima.

Las proteínas EGFP (A), el control positivo EGFP-NES (B) y la proteína de fusión EGFP-ODDD (C) fueron transfectadas en células S2 de *Drosophila* y la localización subcelular de cada proteína fue analizada por microscopía confocal, dos horas después del agregado de LMB (+) o del solvente control (-), para luego determinar la relación de fluorescencia núcleo:citoplasma (N:C) (D). Se analizó el efecto de la LMB utilizando el test estadístico t-Student (\*,  $P < 10^{-7}$ ;  $N > 21$ ). (A) Como es de esperar EGFP es insensible a la LMB; el control positivo EGFP-NES (B) y la construcción EGFP-ODDD (C) respondieron a LMB, tornándola más nuclear (ver cuantificaciones en D). Esto sugiere la existencia de una NES dependiente de CRM1/Embargoed dentro del ODDD de Sima.

Como control positivo para esta serie de experimentos, utilizamos una fusión de EGFP a una NES (EGFP-NES) regulable por CRM1/embargoed (Roth et al., 2003), la cual deriva de la proteína

PKI (“Protein Kinase A Inhibitor”) (Wen et al., 1994). En ausencia de LMB esta quimera presentó una localización principalmente citoplasmática (**Figura 30B**), con una relación N/C de 0,7 (**Figura 30D**), mientras que en presencia de LMB su localización se tornó más nuclear (**Figura 30B**), adoptando una relación N/C de 0,9 (**Figura 30D**). A continuación, analizamos si dentro del ODDD de Sima existe una NES dependiente de CRM1. Para ello fusionamos el ODDD completo a EGFP y realizamos transfecciones transcientes en células S2. En ausencia de LMB la quimera EGFP-ODDD presentó una localización subcelular similar a la de EGFP (**Figuras 30C-D**), pero al agregar LMB su localización fue notoriamente más nuclear (**Figura 30C**), presentando una relación N/C de 1,9 (**Figura 30D**). Estos resultados sugieren fuertemente que existe una NES dependiente de CRM1/Embargoed dentro del ODDD de Sima.

A continuación, con el fin de acotar la zona en que se encuentra la NES, decidimos dividir al ODDD en tres fragmentos, a los cuales denominamos ODDD1, ODDD2 y ODDD3 (**Figura 31A**).

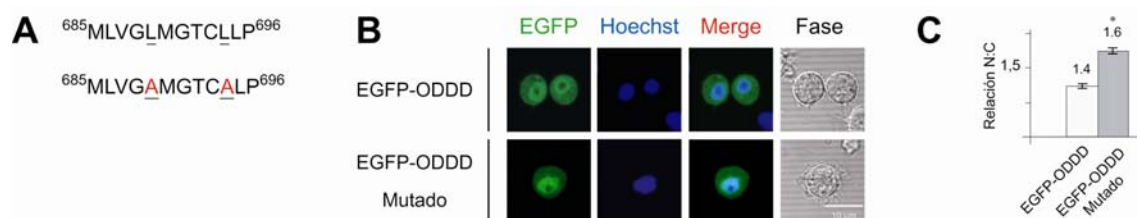


**Figura 31.** La NES del ODDD se encuentra entre los aminoácidos 669 y 730.

(**A**) El dominio ODDD fue dividido en tres fragmentos parcialmente solapados -denominados ODDD1 (aa 669-730), ODDD2 (aa 725-803) y ODDD3 (aa 797-870)-, los cuales fueron fusionados a EGFP. (**B-D**) Las construcciones fueron transfectadas en células S2 para el análisis de la localización subcelular y sensibilidad a LMB. (**D**) Se determinó la relación de intensidades de fluorescencia núcleo: citoplasma (N:C) para cada construcción y se analizó luego el efecto de la LMB utilizando el test estadístico t-Student (\*,  $P < 10^{-7}$ ;  $N > 21$ ). Mientras que la construcción EGFP-ODDD1 (**B**) se tornó más nuclear tras el agregado de LMB, EGFP-ODDD2 (**C**) y EGFP-ODDD3 (**D**) no alteraron su localización subcelular al agregar LMB. Estos resultados sugieren que en el fragmento 669-730 existe una NES dependiente de CRM1/Embargoed. (**E**) santificación de la relación núcleo: citoplasma (N:C) de cada una de las construcciones con o sin el agregado de leptomicina B (LMB).

Con estos fragmentos generamos tres proteínas de fusión a EGFP, las cuales fueron transfectadas en células S2, luego de lo cual evaluamos la localización subcelular de cada quimera en ausencia o en presencia de LMB (**Figuras 31B-E**). Solamente EGFP-ODDD1 mostró un cambio significativo en su localización subcelular tras el agregado de LMB, sugiriendo la presencia de la NES dentro de este fragmento.

En la **Figura 32A** se muestra la secuencia de aminoácidos dentro del ODDD1 que podría corresponder a una NES no-canónica, por su alto contenido de residuos hidrofóbicos. Con el propósito de definir si esta secuencia es la responsable de la respuesta del ODDD a la LMB en células S2, decidimos realizar dos mutaciones puntuales que afectan aa hidrofóbicos en el contexto del dominio ODDD completo (**Figura 32A**). La forma mutada de EGFP-ODDD tuvo una localización claramente más nuclear que la del ODDD original (**Figuras 32B-C**), sugiriendo que la secuencia mutada corresponde a una NES funcional.



**Figura 32.** Identificación de una NES en la secuencia comprendida entre los aminoácidos 669 y 730 del ODDD.

(A) Secuencia aminoacídica de la señal de exportación nuclear candidata (aa 685-696) en el fragmento ODDD1; los residuos de leucina 689 y 694 fueron reemplazados por alaninas (aa en rojo). (B) Tanto la secuencia del ODDD completo original como la secuencia mutada fueron fusionadas a EGFP y transfectadas a células S2 para analizar su localización subcelular. La EGFP fusionada a la secuencia mutada presentó una localización claramente más nuclear que la observada en la fusión con el ODDD original. (C) La forma mutada del ODDD mostró una relación núcleo:citoplasma mayor que la secuencia original ( $P < 10^{-15}$ ,  $N > 30$ ), sugiriendo que las leucinas mutagenizadas son parte de una NES dependiente de CRM1/Embargoed.

Puesto que estos estudios fueron realizados en células S2 de *Drosophila*, con el dominio ODDD aislado, a continuación decidimos analizar si en el contexto de la proteína entera, en embriones transgénicos, la localización subcelular de Sima se ve afectada tras mutagenizar esta presunta NES.

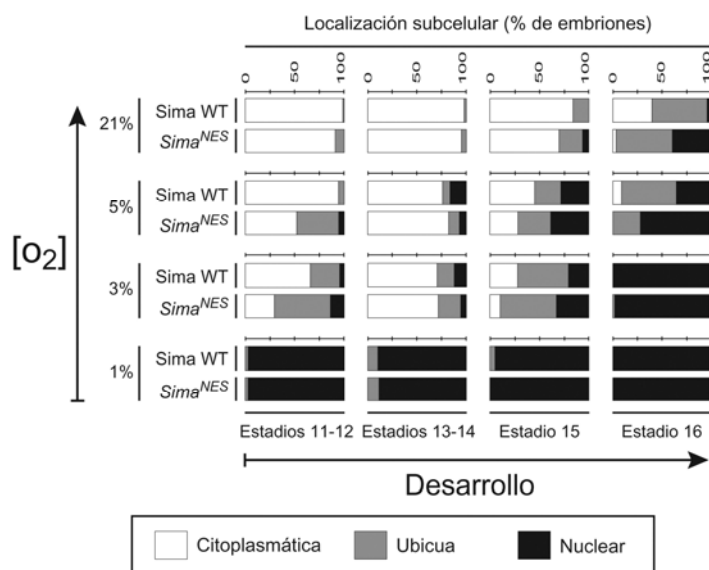
### 2.c.5) Efecto de la NES del ODDD en el contexto de la proteína entera.

#### 2.c.5.a) Localización subcelular de Sima en el equilibrio.

Con el objeto de analizar si la NES del ODDD es funcional en embriones transgénicos, mutagenizamos la secuencia candidata en el contexto de la proteína Sima completa, para luego clonar la proteína mutagenizada (Sima<sup>NES</sup>) río abajo del promotor *UAS* (*UAS.Sima<sup>NES</sup>*). A partir de esta construcción, obtuvimos líneas transgénicas, las cuales cruzamos con la línea *en.Gal4* para evaluar la localización subcelular de la proteína en los embriones de la progenie. Al igual que en



experimentos anteriores, los embriones fueron clasificados en función de la localización subcelular de Sima en las tres categorías descritas en la **Figura 23**. La mutación en la NES del ODDD provocó que Sima fuera más nuclear que Sima WT para la mayoría de las condiciones y estadios analizados (**Figura 33**, análisis estadístico por Chi-cuadrado en el **Apéndice 2**). Este resultado sugiere que la NES del ODDD es necesaria para la regulación de la localización subcelular de Sima. A continuación, decidimos buscar una evidencia directa de que la NES del ODDD es necesaria para la exportación nuclear de Sima.



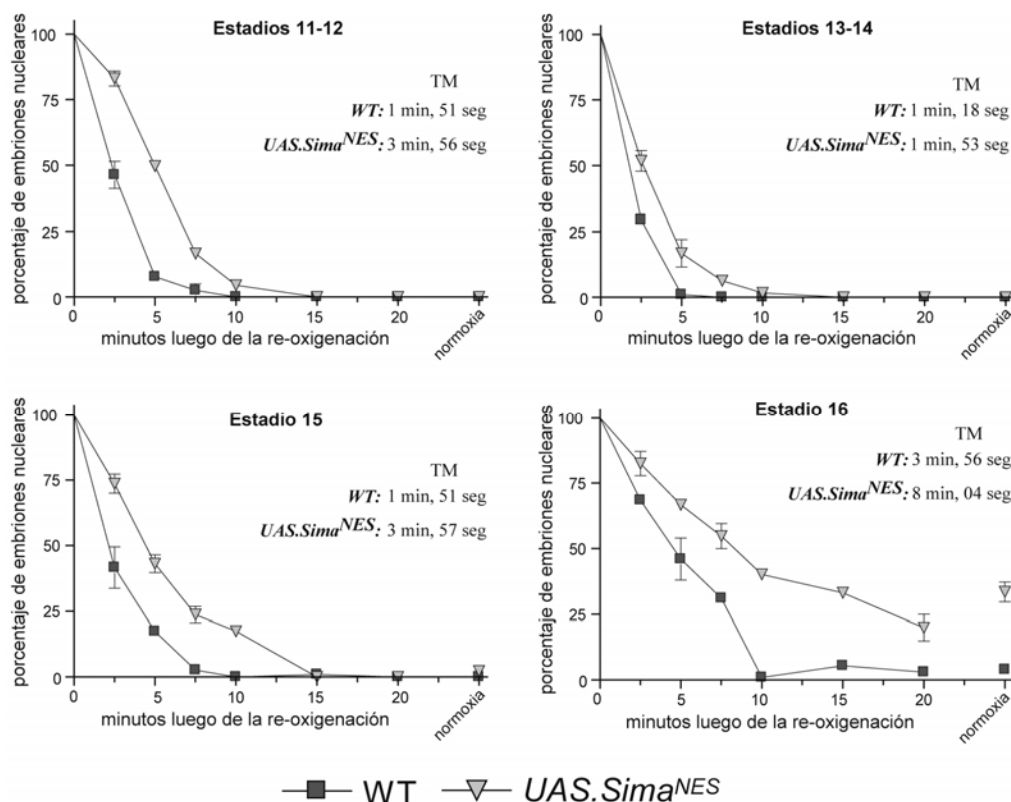
**Figura 33.** Análisis cuantitativo de la localización subcelular de Sima<sup>NES</sup> en embriones transgénicos en el equilibrio.

La proteína Sima WT y la forma mutada en la NES del ODDD (Sima<sup>NES</sup>) fueron expresadas en embriones transgénicos usando el inductor *en.Gal4* y se analizó la localización subcelular de estas proteínas, usando un anticuerpo específico contra Sima, a diferentes concentraciones de oxígeno a lo largo del desarrollo embrionario. La mutación en dicha NES provocó que Sima presentara una localización más nuclear que la forma WT en las diferentes condiciones analizadas,

sugiriendo fuertemente que los residuos Leu689 y Leu694 forman parte de una NES necesaria para la regulación normal de la localización subcelular de Sima in vivo (análisis estadístico en el **Apéndice 2**).

#### 2.c.5.b) Cinética de exportación de Sima mutada en la NES del ODDD en ensayos de re-oxigenación.

Para obtener una medida directa de la cinética de exportación de Sima<sup>NES</sup>, se utilizó un ensayo de re-oxigenación puesto a punto en el laboratorio por la Lic. Nuria Romero (ver Materiales y Metodos). Brevemente, los embriones sobre-expresando Sima WT o Sima<sup>NES</sup> fueron expuestos a una atmósfera de 1% de O<sub>2</sub> durante 4 horas, para luego ser transferidos a normoxia y fijados a diferentes tiempos luego de la re-oxigenación. En la **Figura 34** se grafica la variación en la proporción de embriones conteniendo a Sima en el núcleo en función del tiempo luego de la re-oxigenación (gráfico de barras en **Apéndice 3**). La cinética de exportación de Sima<sup>NES</sup> fue significativamente más lenta que la observada en la proteína WT en los cuatro estadios del desarrollo analizados (test estadístico de Kaplan-Meyer en el **Apéndice 4**). Además, los tiempos medios para exportar a la proteína mutada en el 50% de los embriones (TM) fueron mayores que los obtenidos para la proteína WT (**Figura 34**).



**Figura 34.** La NES del ODDD es necesaria para la exportación nuclear de Sima. Variación en la proporción de Sima WT o Sima<sup>NES</sup> localizada en el núcleo a distintos tiempos luego de la re-oxigenación de los embriones de diferentes estadios del desarrollo, que habían sido previamente expuestos a una atmósfera de oxígeno 1%. La velocidad de exportación nuclear de Sima<sup>NES</sup> fue más lenta que la de Sima WT, con un **TM** mayor (tiempo necesario para exportar a Sima del núcleo en el 50% de los embriones).

Estos resultados sugieren fuertemente que los residuos Leu689 y Leu694 forman parte de una NES dependiente de CRM1/Embargoed, ubicada dentro del ODDD. A fin de caracterizar la maquinaria celular involucrada en la exportación nuclear de Sima y confirmar la participación de Embargoed en dicho proceso, decidimos inicialmente analizar en detalle la localización subcelular de Sima en embriones homocigotas para diferentes alelos de *embargoed*.

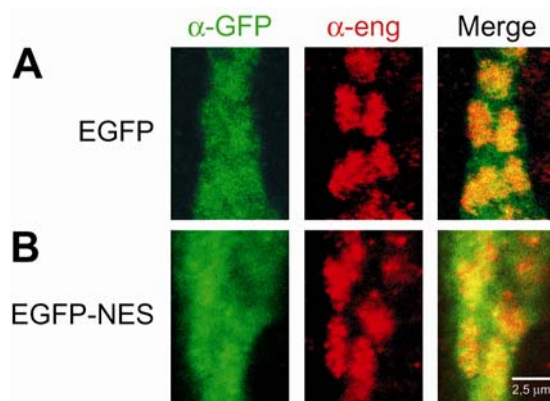
### 2.c.6) Participación del exportador nuclear CRM1/embargoed en la regulación de la localización subcelular de Sima.

#### 2.c.6.a) Experimentos de pérdida de función.

Para analizar el efecto de la pérdida de función de *embargoed* en la localización subcelular de Sima contábamos con tres alelos mutantes para este gen: *emb<sup>2</sup>* y *emb<sup>3</sup>*, ambos caracterizados en estadios larvales (Collier et al., 2000; Roth et al., 2003) y un tercer alelo, *l(2)k16715*, no caracterizado previamente (Bloomington Stock Center), al cual nos referiremos como *emb<sup>k16715</sup>*. Dado que nuestros estudios de localización subcelular se llevan a cabo en el estadio embrionario y que dos de estos alelos estaban caracterizados previamente pero en estadios larvales, fue necesario

en primer lugar determinar si dichos alelos presentaban un fenotipo de pérdida de función de *embargoed* en embriones.

Como reportero para nuestro experimento utilizamos la proteína EGFP-NES, la cual incluye una NES heteróloga dependiente de Embargoed previamente caracterizada (Roth et al., 2003; Wen et al., 1994). Clonamos EGFP-NES bajo el control del promotor *UAS*, para luego generar líneas transgénicas. Como control negativo generamos una línea transgénica que expresa a EGFP bajo el mismo promotor (*UAS.EGFP*). Inicialmente, evaluamos la expresión de EGFP y EGFP-NES en las líneas transgénicas y analizamos la localización subcelular de los reporteros, luego de cruzar dichas líneas con la línea inductora *en.GAL4*. Los resultados fueron observados por inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo anti-GFP y para la visualización de los núcleos, usamos un anticuerpo monoclonal contra la proteína Engrailed, factor de transcripción localizado constitutivamente en el núcleo (**Figura 22B**). Ambas líneas tuvieron buenos niveles de expresión en embriones (**Figura 35**). La EGFP sola presentó una distribución ubicua dentro de las células con una leve tendencia a acumularse en el núcleo (**Figura 35A**), siguiendo un comportamiento similar al observado en células S2 (**Figura 27A**). La distribución de EGFP-NES fue claramente más homogénea entre los dos compartimentos (**Figura 35B**); nuestra interpretación es que la exportación mediada por la NES contrarresta la tendencia natural de EGFP a acumularse en el núcleo (**Figura 35A**).



**Figura 35.** Localización subcelular de las proteínas reporteras EGFP y EGFP-NES en embriones transgénicos.

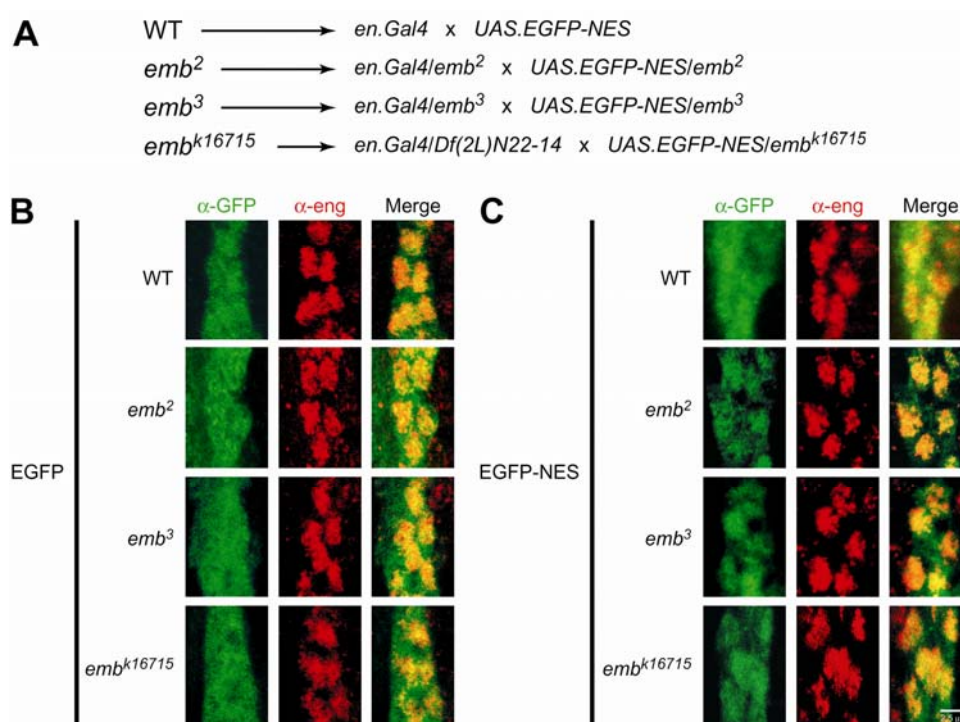
EGFP o EGFP-NES fueron expresadas en embriones transgénicos bajo el control del inductor *en.Gal4* y la localización subcelular fue analizada con un anticuerpo anti-GFP (verde). Para marcar los núcleos se utilizó un anticuerpo contra la proteína endógena Engrailed (rojo). En la fotografía se muestran células que expresan EGFP en una de las bandas de *engrailed*. EGFP presentó una distribución ubicua con tendencia a acumularse en el núcleo; la localización de EGFP-NES

presentó una distribución más homogénea entre los dos compartimentos (desapareció la prevalencia nuclear), presuntamente por acción de la señal de exportación nuclear.

Para caracterizar los distintos alelos de pérdida de función de *embargoed*, expresamos los dos reporteros, EGFP y EGFP-NES, en embriones mutantes para dicho gen. Mediante recombinación meiótica (ver Materiales y Métodos)<sup>3</sup>; colocamos en el mismo cromosoma a cada reportero (*UAS.EGFP* o *UAS.EGFP-NES*) con cada uno de los tres alelos mutantes para el gen *embargoed* (*emb2*, *emb3* y *emb<sup>k16715</sup>*) (**Figura 36A**). Estas líneas recombinantes fueron cruzadas con la línea

<sup>3</sup> En adelante cuando se utilice el término *recombinación* estaremos haciendo referencia al proceso de recombinación meiótica que ocurre en las gónadas de las hembras (ver Materiales y Métodos).

inductora *en.Gal4* en la cual también se había introducido por recombinación a los alelos *emb<sup>2</sup>* o *emb<sup>3</sup>*, o a una deleción cromosómica denominada *Df(2L)N22-14* que incluye al gen *embargoed* (**Figura 36A**). De esta manera, cruzando *en.Gal4/emb<sup>-</sup>* por *UAS.EGFP/emb<sup>-</sup>* o *EGFP-NES/emb<sup>-</sup>* nos aseguramos que la sobre-expresión de los reporteros ocurra solamente en aquellos embriones homocigotas para los distintos alelos mutantes de *embargoed*. La localización de EGFP fue esencialmente ubicua con leve tendencia a acumularse en el núcleo en embriones WT y no mostró un cambio en su localización subcelular con ninguno de los tres alelos mutantes de *embargoed* (**Figura 36B**). Contrariamente, EGFP-NES fue notablemente más nuclear en los embriones mutantes para *emb* en comparación con los embriones WT (**Figura 36C**), indicando que los tres alelos mutantes efectivamente presentan pérdida de función del gen *embargoed* en el estadio embrionario.



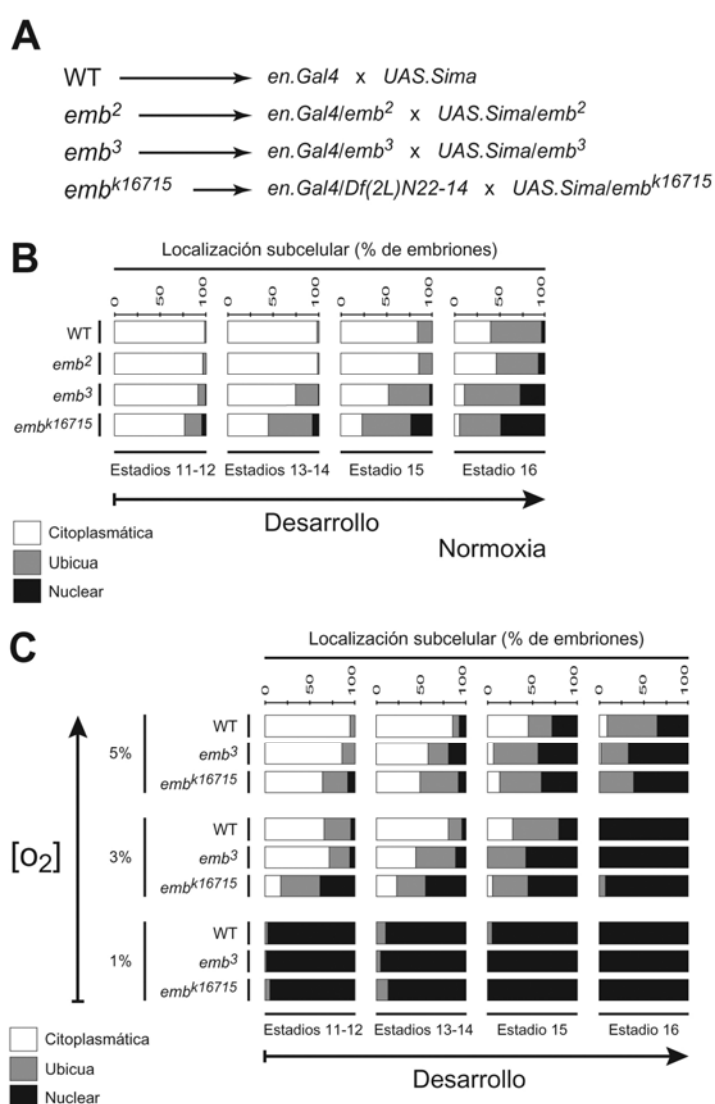
**Figura 36.** Caracterización de los alelos mutantes de *embargoed* en embriones.

(A) Cruzamientos para analizar el efecto de cada uno de los alelos de *emb*. La localización subcelular de las proteínas reporteras EGFP (B) y EGFP-NES (C) fue analizada con un anticuerpo anti-GFP (verde); se utilizó un anticuerpo anti-Engrailed (rojo), para marcar los núcleos. (B) EGFP no mostró cambios en su localización subcelular con ninguno de los tres alelos mutantes para *emb* con respecto a embriones WT. (C) La proteína EGFP-NES se tornó más nuclear en embriones homocigotas mutantes para los tres alelos de *emb*, en comparación con la localización de esta proteína en embriones WT.

Una vez caracterizados los tres alelos mutantes del exportador nuclear en embriones, nuestro siguiente paso fue determinar si dichos alelos afectan la regulación de la localización subcelular de Sima.

i. Efecto sobre la localización de Sima en el equilibrio.

Utilizamos la estrategia genética descrita en la **Figura 36A**, en la que los alelos *emb<sup>2</sup>* y *emb<sup>3</sup>* fueron recombinados con los elementos *UAS.sima* y *en.Gal4* (**Figura 37**). Cabe destacar que para analizar el efecto del alelo *emb<sup>k16715</sup>*, sobre-expresamos Sima en embriones *emb<sup>k16715</sup>/Df(2L)N22-14*, deleción cromosómica que incluye al gen *embargoed*. Para ello generamos una línea con el elemento *UAS.sima* recombinado con el alelo *emb<sup>k16715</sup>* en el mismo cromosoma, la cual cruzamos por otra línea con el elemento *en.Gal4* recombinado a la deleción *Df(2L)N22-14* (**Figura 37A**). Mediante esta estrategia nos aseguramos que todos los embriones que sobre-expresan Sima presenten a la vez pérdida de función de *embargoed*.



**Figura 37.** Efecto de las mutaciones en el gen *embargoed* sobre la localización subcelular de Sima en embriones transgénicos.

(A) Cruzamiento para analizar el efecto de cada uno de los alelos de *emb*. Se evaluó la localización subcelular de Sima en embriones WT o en embriones con pérdida de función de *emb* en normoxia (B) o en hipoxia (C), para distintos estadios del desarrollo. (B) En normoxia embriones homocigotas para el alelo *emb<sup>2</sup>* mostraron una distribución de Sima parecida a la de embriones WT, mientras que los embriones homocigotas para *emb<sup>3</sup>* y *emb<sup>k16715</sup>* mostraron una localización de Sima claramente más nuclear que la de los embriones WT. (C) En distintas condiciones de hipoxia, los embriones homocigotas para *emb<sup>3</sup>* y *emb<sup>k16715</sup>* también mostraron una localización de Sima más nuclear que la de embriones WT.

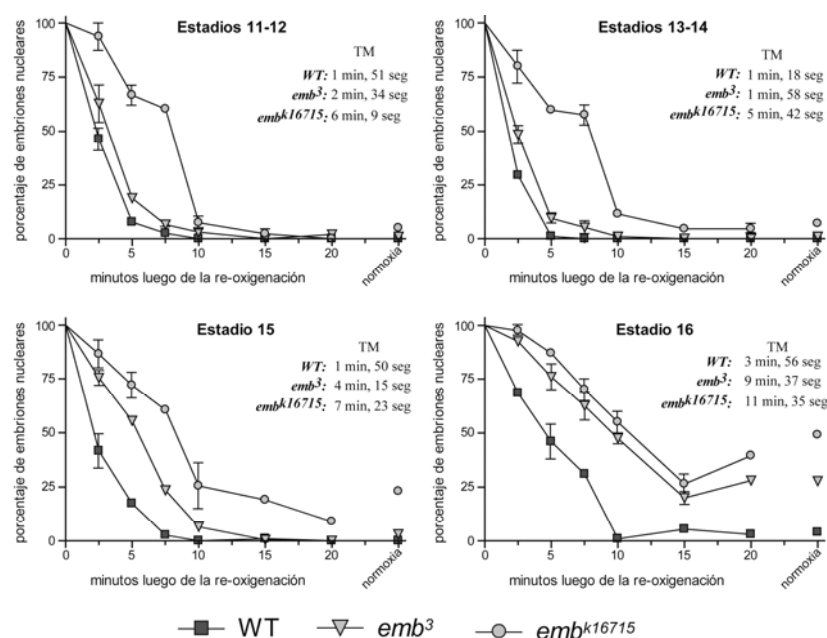
La localización subcelular de Sima en embriones homocigotas para *emb<sup>2</sup>* en normoxia, fue similar a la observada en embriones WT (**Figura 37B**, análisis estadístico en el **Apéndice 5**), mientras que en homocigotas para los alelos *emb<sup>3</sup>* y *emb<sup>k16715</sup>*, Sima mostró un aumento en la proporción de embriones clasificados como “nucleares” en todos los estadios del desarrollo

analizados en normoxia (**Figura 37B**, análisis estadístico en el **Apéndice 5**). A continuación, realizamos el mismo análisis, para los dos alelos que mostraron efectos sobre la localización de Sima (i.e. *emb<sup>3</sup>* y *emb<sup>k16715</sup>*), pero en diferentes condiciones de hipoxia (**Figura 37C**). En embriones homocigotas para *emb<sup>3</sup>* o *emb<sup>k16715</sup>*, Sima fue significativamente más nuclear que en los embriones WT tanto en 5% como 3% de oxígeno (análisis estadístico en los **Apéndices 6 y 7**). En O<sub>2</sub> 1% la mayoría de los embriones WT presentaron localización nuclear de Sima en todos los estadios analizados (**Figura 37C**), de modo que no pudo evidenciarse un posible efecto de los alelos mutantes.

Estos resultados sugieren fuertemente que Sima es activamente exportada in vivo del núcleo al citoplasma en un proceso mediado al menos en parte por el receptor de exportación nuclear Embargoed; esto pudo ser verificado en distintas concentraciones de oxígeno a lo largo del desarrollo.

ii. Efecto de la pérdida de función de embargoed sobre la cinética de exportación de Sima tras la re-oxigenación de los embriones.

Se utilizaron las mismas líneas recombinantes del punto anterior (**Figura 37A**). Como se observa en la **Figura 38** (en el **Apéndice 8** se muestra el gráfico de barras), la exportación nuclear de Sima fue más lenta en embriones mutantes para *embargoed*, en comparación con embriones WT (análisis estadístico en el **Apéndice 9**).



**Figura 38.** Cinética de exportación de Sima en embriones con pérdida de función de *embargoed* en ensayos de re-oxigenación.

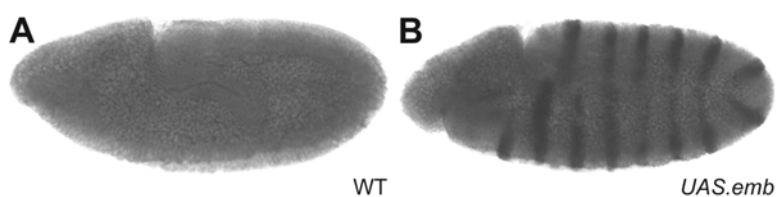
Los embriones fueron expuestos a una atmósfera con 1% de oxígeno durante 4 horas; luego, fueron transferidos a normoxia y fijados a diferentes tiempos luego de la re-oxigenación para analizar la localización de Sima por inmunofluorescencia. El gráfico muestra la variación en la proporción de Sima localizada en el núcleo en función del tiempo luego de la re-oxigenación, en

embriones de distintos estadios del desarrollo. En embriones WT Sima fue exportada totalmente en aproximadamente 10 minutos luego de la re-oxigenación, en todos los estadios. En cambio, en embriones homocigotas para *emb<sup>3</sup>* o *emb<sup>k16715</sup>* la exportación nuclear fue más lenta, con un valor de **TM** (tiempo necesario para exportar a Sima del núcleo en el 50% de los embriones) mayor que el de embriones WT, sugiriendo fuertemente que el receptor CRM1/Embargoed participa en la exportación nuclear de Sima.

Esta diferencia en la cinética de exportación de Sima también se vio reflejada en el valor del TM (tiempo, luego de la re-oxigenación, necesario para exportar a Sima del núcleo en el 50% de los embriones) (**Figura 38**). Nótese que si bien la cinética de exportación de Sima fue más lenta en embriones con pérdida de función de *embargoed*, la proteína continuó siendo exportada del núcleo. Esto sugiere que existiría un segundo mecanismo que media la exportación nuclear de Sima.

#### 2.c.6.b) Sobre-expresión del Receptor de Exportación Nuclear CRM1/Embargoed.

Para confirmar el rol de *embargoed* en la localización subcelular de Sima, decidimos evaluar si luego de sobre-expresar a dicho exportador se altera la localización subcelular de Sima. La sobre-expresión de *embargoed* fue llevada a cabo mediante el sistema Gal4/UAS. Para ello obtuvimos el ADN copia del gen *embargoed* a partir de un EST de la colección de Open Biosystems (EST LD45706) y lo clonamos río abajo del promotor *UAS*, para generar líneas transgénicas (*UAS.embargoed*). La sobre-expresión de *embargoed* en las líneas transgénicas fue verificada por hibridización in situ del ARN mensajero, luego de cruzar las líneas transgénicas obtenidas por la línea inductora *en.Gal4* (**Figura 39**).



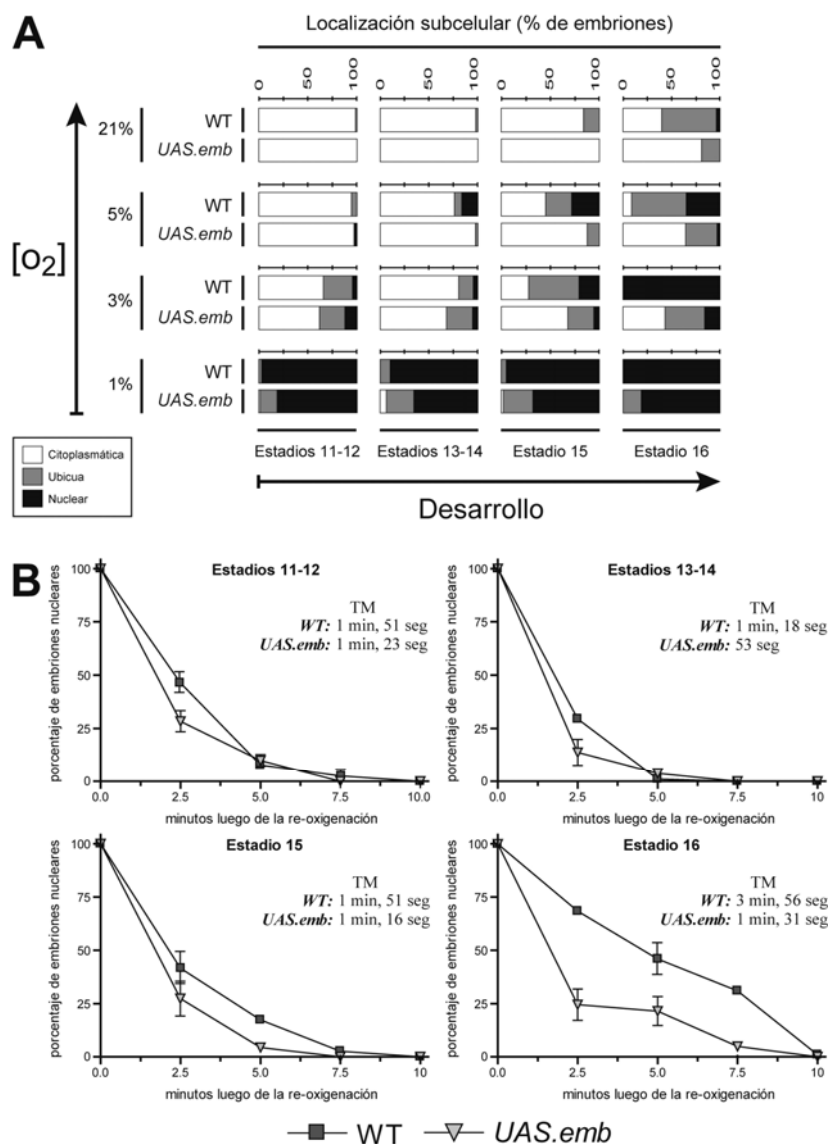
**Figura 39.** Sobre-expresión de *embargoed* en embriones.

Actualmente no hay anticuerpos contra Embargoed disponibles. Decidimos por lo tanto evaluar los niveles de expresión del gen en las líneas transgénicas *UAS.emb* analizando los niveles de mRNA mediante la técnica

de Hibridización in situ. **(A)** En embriones WT se observa una señal ubicua. **(B)** Al sobre-expresar Embargoed bajo el control del promotor de *engrailed* observamos la señal de la sonda de *emb* en el patrón característico de 14 bandas a lo largo del embrión, confirmando que el transgén se expresa correctamente.

#### *i. Efecto de la sobre-expresión de embargoed sobre la localización subcelular de Sima en el equilibrio.*

Recombinamos en un mismo cromosoma el elemento *UAS.sima* junto con *UAS.embargoed*, para asegurarnos que todos los embriones que expresaban Sima también sobre-expresaran Embargoed. La sobre-expresión del exportador provocó que Sima se tornara más citoplasmática que en embriones WT. El efecto fue especialmente notorio en los estadios 15 y 16 de la embriogénesis y pudo ser verificado en todos los niveles de oxígeno analizados (**Figura 40A**, análisis estadístico en el **Apéndice 10**).



**Figura 40.** Localización subcelular de Sima en embriones que sobre-expresan *embargoed*.

Efecto de la sobre-expresión de *embargoed* sobre la localización subcelular de Sima, en distintos estadios del desarrollo embrionario, en el equilibrio (A) o en ensayos de re-oxigenación (B). (A) Placas conteniendo embriones de distintos estadios embrionarios fueron incubadas durante 4 horas a diferentes concentraciones de oxígeno, para luego analizar la localización de la proteína por inmunofluorescencia. Los embriones que sobre-expresan *embargoed* mostraron una localización de Sima más citoplasmática que la de embriones WT, en todas las condiciones analizadas. (B) Placas con embriones fueron expuestas a 1% de oxígeno durante 4 horas; luego fueron transferidas a normoxia y los embriones fueron fijados a diferentes tiempos luego de la re-oxigenación para analizar la localización subcelular de Sima por inmunofluorescencia. La

exportación de Sima en embriones que sobre-expresan *Embargoed* fue más rápida que en embriones WT (con valores de TM menores). Esto fue especialmente evidente en los estadios tardíos del desarrollo (estadios 15 y 16), sugiriendo fuertemente que la mayor actividad de CRM1/*Embargoed* aumenta la tasa de exportación nuclear de Sima, incrementando la proporción de proteína en el citoplasma.

Estos resultados muestran que la sobre-expresión del receptor de exportación nuclear *Embargoed* modifica la localización subcelular de Sima en el equilibrio. Nuestro siguiente paso fue evaluar el efecto de la sobre-expresión de *Embargoed* sobre la cinética de exportación de Sima en ensayos de re-oxigenación.

ii. *Efecto de la sobre-expresión de Embargoed sobre la cinética de exportación de Sima.*

Los embriones recombinantes que sobre-expresan Sima y *Embargoed* fueron expuestos a una atmósfera con 1% de oxígeno durante 4 horas, luego transferidos a normoxia para realizar fijaciones a distintos tiempos, seguidos de la detección de Sima por inmunofluorescencia. Estos experimentos de re-oxigenación revelaron que la cinética de exportación de Sima en embriones que



sobre-expresan Embargoed es más rápida que la observada en embriones WT (**Figura 40**, gráfico de barras en el **Apéndice 11**), especialmente en los estadios 15 y 16 (análisis estadístico en el **Apéndice 12**).

Los resultados obtenidos mediante experimentos tanto de pérdida como de ganancia de función del receptor de exportación nuclear *embargoed* demuestran que la abundancia de dicho exportador modula la localización subcelular de Sima.

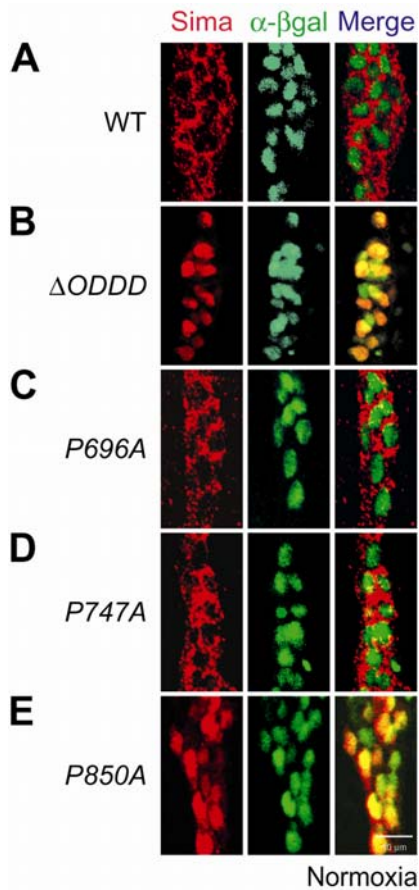
## **2.d.) Regulación por oxígeno de la exportación de Sima.**

Como se describió en el punto 2.c.3.) (**Figura 29**) la delección del ODDD de Sima tornó a la proteína totalmente nuclear, independientemente de los niveles de oxígeno. Consistente con esto, encontramos dentro del ODDD una señal de exportación nuclear (NES) dependiente de CRM1. Estos resultados nos indujeron a hipotetizar que la hidroxilación en la prolina 850 que regula la degradación de Sima, tal vez controle también su localización subcelular.

### ***2.d.1) Función de la hidroxilación de residuos de prolina en la localización subcelular de Sima.***

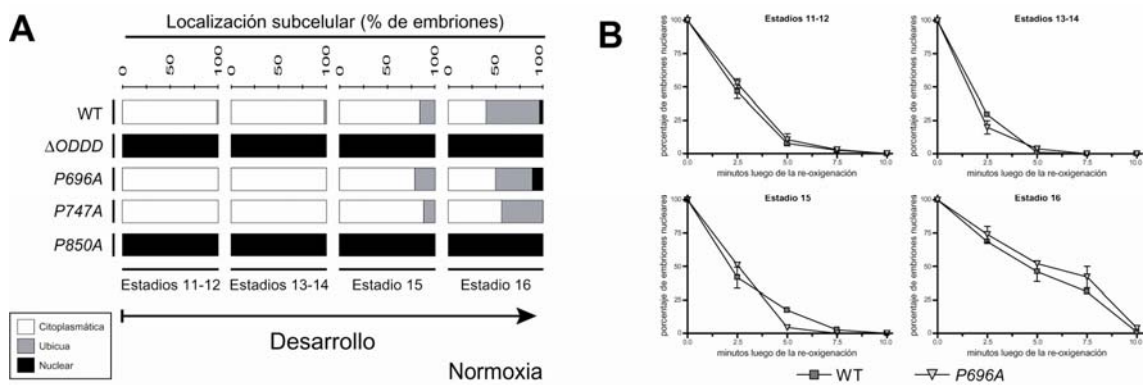
Para analizar si la hidroxilación de residuos de prolina del ODDD participa en la regulación de la localización subcelular de Sima, utilizamos las líneas transgénicas sobre-expresando formas mutadas de la proteína, en las que cada uno de los tres residuos de prolina presuntamente hidroxilables dentro del ODDD fue reemplazado por alanina (*UAS.simaP696A*, *UAS.simaP747A*, *UAS.simaP850A*). Como en experimentos anteriores, la expresión de estas construcciones fue inducida cruzándolas con la línea *en.Gal4* y además se incluyó el transgen *UAS.GFPn-LacZ* para marcar los núcleos (**Figura 41**). Se describió más arriba que Sima WT presenta una localización principalmente citoplasmática en normoxia (**Figura 41A**) y que en dichas condiciones Sima $\Delta$ ODDD es constitutivamente nuclear (**Figura 41B**).

El análisis de la localización subcelular de las formas mutadas de Sima arrojó los siguientes resultados: SimaP696A y SimaP747A no mostraron cambios evidentes en la localización subcelular con respecto a Sima WT en normoxia (**Figuras 41C-D** y **42A**) y SimaP850A presentó una localización totalmente nuclear aún en normoxia (**Figuras 41E** y **42A**), de manera similar a lo observado con Sima $\Delta$ ODDD. Mediante ensayos de re-oxigenación tampoco logramos observar diferencias en el comportamiento de SimaP696A (**Figura 42B**) o SimaP747A (datos no mostrados).



**Figura 41.** La prolina 850 del ODDD de Sima es necesaria para la localización citoplasmática de la proteína en normoxia.

Localización subcelular de Sima completa (A), deletionada en el dominio ODDD (Sima $\Delta$ ODDD) (B) o mutada en distintos residuos de prolina: SimaP696A (C), SimaP747A (D) y SimaP850A (E). Las construcciones fueron expresadas en embriones transgénicos bajo el control del inductor *en.Gal4* y la localización subcelular fue analizada por inmunofluorescencia (rojo). Los embriones co-expresaban también una forma de LacZ con localización nuclear (*LacZn*), para visualizar los núcleos con un anticuerpo anti- $\beta$ -Gal (verde). En la fotografía se muestran algunas de las células de una de las bandas de expresión de *engrailed*. Tanto Sima WT como las formas mutadas SimaP696A y SimaP747A fueron predominantemente citoplasmáticas en normoxia; Sima $\Delta$ ODDD y la forma mutada en la prolina 850 exhibieron una localización constitutivamente nuclear aún en normoxia, mostrando que la Prolina850 está involucrada en la regulación de la localización subcelular de Sima.



**Figura 42.** Función de los residuos de prolina putativamente hidroxilados en la localización subcelular de Sima.

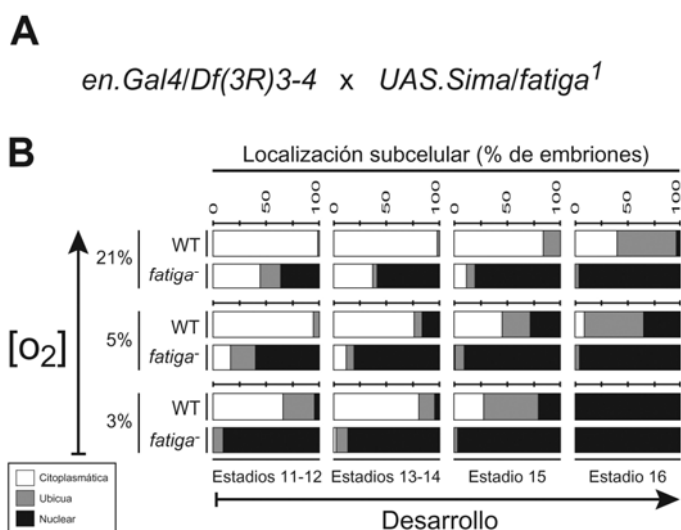
Distintas formas de Sima fueron expresadas en embriones transgénicos bajo el control del inductor *en.Gal4*, para luego realizar un análisis cuantitativo de la localización subcelular de Sima en situación de equilibrio (A) o en ensayos de re-oxigenación (B). (A) La localización subcelular de las formas mutadas en los residuos de prolina 696 y 747 fueron similares a la de Sima WT en normoxia. Tanto Sima $\Delta$ ODDD como SimaP850A presentaron una localización 100% nuclear en normoxia. (B) La cinética de exportación de SimaP696A fue similar a la de Sima WT, en todos los estadios del desarrollo analizados.

Estos resultados indican que solamente la prolina 850 es necesaria para la regulación de la localización subcelular de la proteína, abriendo la posibilidad de que la hidroxilación de este residuo sea requerida para la localización subcelular de Sima. Por lo tanto, decidimos a continuación evaluar el rol de la prolil hidroxilasa sobre la localización citoplasmática de Sima en normoxia.

### 2.d.2) Función de la prolil hidroxilasa/fatiga en la localización subcelular de Sima.

#### 2.d.2.a) Efectos de pérdida de función.

Para continuar con el análisis del rol de la hidroxilación de prolinas en la localización subcelular de Sima, realizamos un estudio cuantitativo en embriones mutantes para la *prolil-4-hidroxilasa*, a la cual hemos denominado Fatiga (Centanin et al., 2005). Para ello, sobre-expresamos Sima en embriones trans-heterocigotas para *fatiga*<sup>1</sup> -alelo fuerte de pérdida de función de *fatiga* (Centanin et al., 2005)- y *Df(3R)3-4*, deleción cromosómica que abarca dicho gen. A tal fin, generamos una línea con el elemento *UAS.sima* recombinado en el mismo cromosoma que el alelo *fatiga*<sup>1</sup>. Esta línea fue cruzada por una línea inductora, conteniendo el elemento *en.Gal4* recombinado a la deleción *Df(3R)3-4* que incluye al gen *fatiga* (**Figura 43A**). Mediante esta estrategia nos aseguramos que todos los embriones que sobre-expresan Sima presenten además pérdida de función de *fatiga*. Como se muestra en la **Figura 43B**, en la línea mutante se observó un aumento en la proporción de embriones con Sima nuclear con respecto a embriones WT, en todos los estadios del desarrollo y niveles de oxígeno analizados (análisis estadístico en el **Apéndice 13**).



**Figura 43.** Análisis cuantitativo de la localización subcelular de Sima en embriones con pérdida de función de *fatiga*.

(**A**) Cruzamiento utilizado para sobre-expresar Sima bajo el control del inductor *en.Gal4* en embriones trans-heterocigotas para *fatiga*<sup>1</sup> y para la deleción cromosómica *Df(3R)3-4* que incluye al gen *fatiga*. (**B**) En embriones mutantes para *fatiga*, Sima fue más nuclear que en embriones WT, en todos los niveles de oxígeno analizados a lo largo de la embriogénesis, indicando que la hidroxilación de residuos de prolina sería necesaria para la exportación nuclear de Sima.

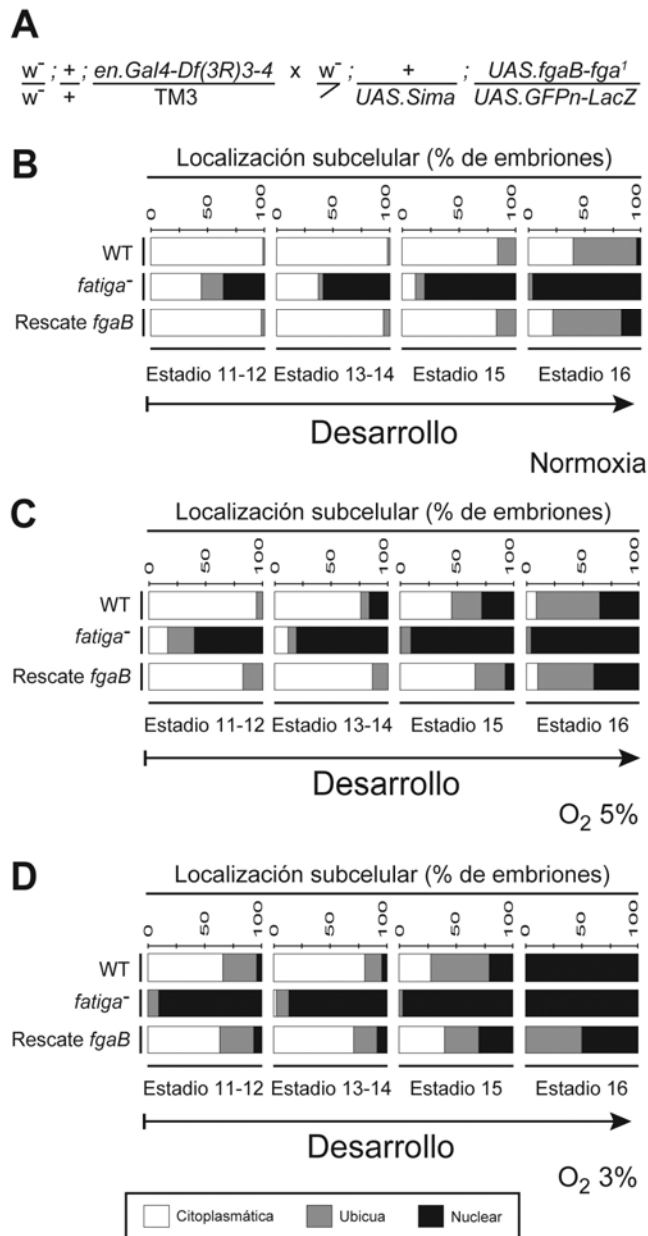
Este resultado sugiere fuertemente que el gen *fatiga* es necesario para la regulación de la localización subcelular de Sima, indicando que la actividad disminuida de Fatiga puede cambiar el balance entre importación y exportación de Sima, dando como resultado un incremento en la proporción de embriones con Sima localizada en el núcleo.

Como se mencionó en la introducción, Lázaro Centanin identificó en nuestro laboratorio tres isoformas del gen *fatiga*, de las cuales solamente la isoforma B fue capaz de rescatar completamente varios de los fenotipos observados tras la pérdida de función de *fatiga*. En consecuencia, decidimos analizar si la sobre-expresión de FatigaB es capaz de revertir el fenotipo de pérdida de función de *fatiga*, con respecto a la localización subcelular de Sima. Para ello, realizamos cruzamientos (**Figura 44A**) para colocar en un mismo embrión los elementos necesarios para el experimento:

- a) Las proteínas a sobre-expresar: Sima (mediante el transgén *UAS.sima*) y FatigaB (*UAS.fatigaB*),
- b) El inductor *en.Gal4*,
- c) La mutación *fatiga<sup>1</sup>* y delección cromosómica *Df(3R)3-4*.

Se analizó la localización subcelular de Sima sobre-expresada en estos embriones para diferentes niveles de oxígeno y estadios del desarrollo (**Figuras 44B-D**). FatigaB revirtió completamente el fenotipo de pérdida de función de *fatiga* en normoxia en todos los estadios analizados, con una localización subcelular de Sima similar a la de los embriones WT y claramente más citoplasmática que la mostrada en los embriones mutantes para *fatiga* (**Figura 44B**, análisis estadístico en el **Apéndice 14**). Dicho efecto pudo ser verificado a distintos niveles de oxígeno (**Figuras 44C-D**, análisis estadístico en el **Apéndice 14**).

Estos resultados confirman que FatigaB es necesaria para la regulación de la localización subcelular de Sima. A continuación decidimos evaluar si la sobre-expresión de FatigaB en embriones WT puede modificar el balance entre importación y exportación nuclear de Sima.



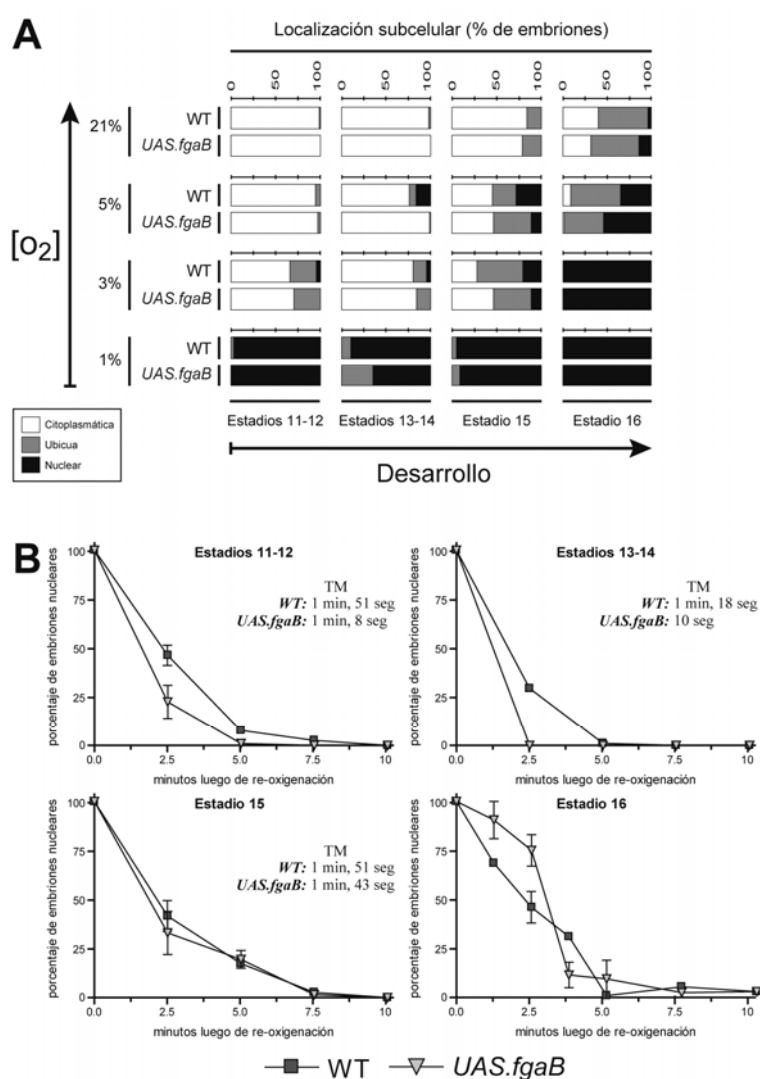
**Figura 44.** Rescate del fenotipo de pérdida de función de *fatiga* por sobre-expresión de *FatigaB*.

(A) Cruzamiento para intentar rescatar el fenotipo de pérdida de función de *fatiga* mediante la sobre-expresión de *fatigaB*. (B-D) Los embriones del genotipo indicado fueron expuestos a distintas concentraciones de oxígeno: 21% O<sub>2</sub> (B), 5% O<sub>2</sub> (C) y 3% O<sub>2</sub> (D), para luego realizar un análisis cuantitativo de la localización subcelular de *Sima*, por inmunofluorescencia. La localización de *Sima* en los embriones que sobre-expresan *FatigaB* se comparó con la localización en embriones WT o con la de embriones con pérdida de función de *fatiga*. La reversión del fenotipo de pérdida de función de *fatiga* por *FatigaB* fue completa en todos los estadios del desarrollo, en las distintas concentraciones de oxígeno analizadas.

#### 2.d.2.b) Efecto de la sobre-expresión de *fatigaB* sobre la localización subcelular de *Sima*.

Para evaluar el efecto de la sobre-expresión de *FatigaB* sobre la localización subcelular de *Sima*, recombinamos los elementos *UAS.sima* y *UAS.fatigaB* en un mismo cromosoma, para luego cruzar esta línea con la línea inductora *en.Gal4* y poder analizar los embriones de la progenie. Embriones que sobre-expresan *FatigaB* no mostraron un cambio significativo en la localización subcelular de *Sima* en comparación con embriones WT (Figura 45A, análisis estadístico en el Apéndice 15). Este resultado sugiere que si bien *fatiga* es necesario para la localización subcelular de *Sima*, su sobre-expresión no afecta la localización subcelular de *Sima* en el equilibrio.

A continuación decidimos evaluar con un método más sensible un posible efecto sobre la localización subcelular de Sima al sobre-expresar *FatigaB*, para lo cual utilizamos los ensayos de re-oxigenación. Como se observa en la **Figura 45B**, la cinética de exportación de Sima fue más rápida al sobre-expresar *fatigaB* en comparación con embriones WT de estadios tempranos del desarrollo (estadios 11-12 y 13-14). En estadios tardíos (estadios 15 y 16) no se pudieron observar diferencias en la cinética de exportación de Sima (gráfico de barras mostrando la distribución de Sima entre las tres categorías en el **Apéndice 16** y análisis estadístico en **Apéndice 17**).



**Figura 45.** Localización subcelular de Sima en embriones que sobre-expresan *fatigaB*.

Efecto de la sobre-expresión de *fatigaB* sobre la localización subcelular de Sima en el equilibrio (**A**) o en ensayos de re-oxigenación (**B**), en distintos estadios del desarrollo embrionario. (**A**) Placas conteniendo embriones de distintos estadios del desarrollo fueron incubadas durante 4 horas a diferentes concentraciones de oxígeno, para luego analizar la localización de Sima por inmunofluorescencia. Embriones sobre-expresando *FatigaB* no mostraron un cambio en la localización subcelular de Sima en comparación con embriones WT en ninguna de las condiciones analizadas. (**B**) Ensayos de re-oxigenación: los embriones fueron expuestos a 1% de O<sub>2</sub> durante 4 horas, luego fueron transferidos a normoxia y fijados a diferentes tiempos luego de la re-oxigenación para analizar la localización subcelular de Sima por inmunofluorescencia. La exportación de Sima en embriones que sobre-expresan *FatigaB* fue ligeramente más rápida que en embriones WT solamente en los estadios 11-12 y 13-14.

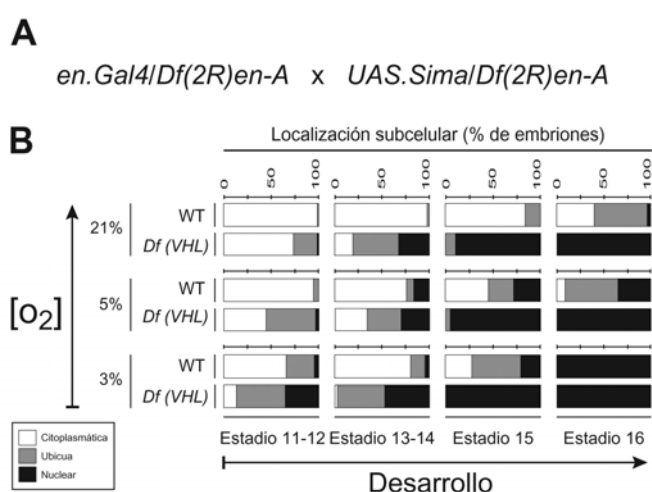
Estos resultados en conjunto sugieren fuertemente que la actividad de *Fatiga* es necesaria no solo para la regulación de la estabilidad proteica de Sima sino también para su correcta localización subcelular. A continuación decidimos analizar si *VHL*, otro gen de la maquinaria de degradación, también es necesario para la regulación de la localización subcelular de Sima.

### 2.d.3) *VHL* es necesario para la regulación de la localización subcelular de *Sima*.

En células de mamíferos deficientes para *VHL* se observaron altos niveles de HIF- $\alpha$ , lo cual correlacionó con una expresión incrementada de genes blancos de HIF, de manera independiente del oxígeno (Maxwell et al., 1999). Esto sugiere que la pérdida de función de *VHL* no sólo provoca la estabilización de HIF- $\alpha$ , sino también su acumulación nuclear (Bonicalzi et al., 2001). En nuestro laboratorio existían resultados preliminares que sugerían que la falta de *VHL* favorecía la localización nuclear de *Sima* (Lavista-Llanos 2005, tesis doctoral). A efectos de analizar esta posibilidad en mayor detalle, realizamos estudios de ganancia y de pérdida de función de *VHL*.

#### 2.d.3.a) Efecto de pérdida de función de *VHL* sobre la localización subcelular de *Sima*.

Dado que no existen alelos mutantes de *VHL*, decidimos analizar la localización de *Sima* en embriones homocigotas para una deleción cromosómica (*Df(2R)en-A*) que incluye al gen (*DfVHL*). Para ello, recombinamos dicha deleción cromosómica tanto con el inductor *en.Gal4*, como con el elemento *UAS.sima*, de modo que todos los embriones que sobre-expresen *Sima* sean homocigotas para la deleción que incluye a *VHL* (**Figura 46A**). Como se observa en la **Figura 46B**, *Sima* fue marcadamente más nuclear en embriones homocigotas para *DfVHL* que en los embriones control (WT), en todas las condiciones analizadas (análisis estadístico en el **Apéndice 18**), sugiriendo que *VHL* es necesario para la localización citoplasmática de *Sima*.



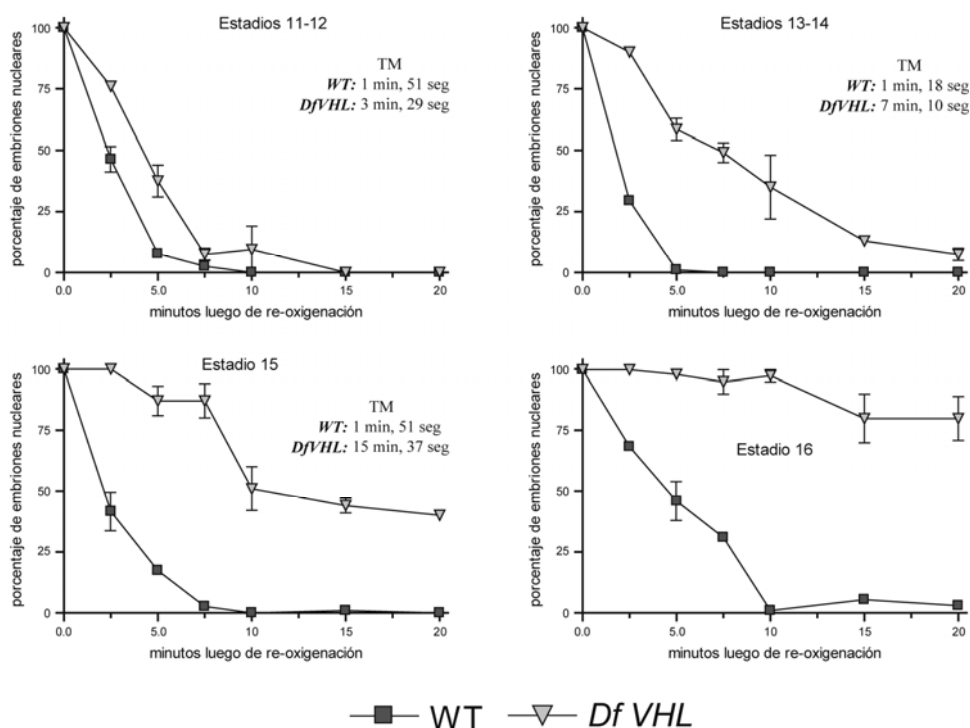
**Figura 46.** Análisis cuantitativo de la localización subcelular de *Sima* en embriones con pérdida de función de *VHL*.

(**A**) Cruzamiento para analizar el efecto de la pérdida de función de *VHL* sobre la localización subcelular de *Sima*. (**B**) En embriones con pérdida de función de *VHL* *Sima* fue más nuclear que en embriones WT, en todos los niveles de oxígeno analizados a lo largo de la embriogénesis, indicando que la actividad de la proteína *VHL* es necesaria para la localización citoplasmática de *Sima*.

Con el propósito de obtener evidencias directas del rol de *VHL* en la exportación nuclear de *Sima*, analizamos la localización de esta proteína en embriones homocigotas para *Df(VHL)* en ensayos de re-oxigenación. La cinética de exportación de *Sima* en los embriones con pérdida de función de *VHL* fue más lenta que en embriones control (**Figura 47**, gráfico de barras en el

Apéndice 19), para todos los estadios embrionarios analizados (análisis estadístico en el Apéndice 20), con valores de tiempo medio de exportación nuclear significativamente más largos (Figura 47).

Estos resultados sugieren fuertemente que la proteína VHL es necesaria para la regulación de la localización subcelular de Sima. Con el propósito de determinar si los niveles de VHL modulan el balance importación/exportación de Sima, evaluamos si la sobre-expresión de VHL puede afectar la localización de Sima, incrementando su exportación nuclear.



**Figura 47.** Cinética de exportación de Sima en embriones con pérdida de función de *VHL*.

Los embriones fueron expuestos a 1% O<sub>2</sub> durante 4 horas, luego de lo cual fueron transferidos a normoxia y fijados a diferentes tiempos post re-oxigenación para analizar la localización subcelular de Sima por inmunofluorescencia. El gráfico muestra la variación en la proporción de Sima localizada en el núcleo a distintos tiempos luego de re-oxigenar los embriones, en distintos estadios del desarrollo. La velocidad de exportación de Sima en embriones homocigotas para *DfVHL* fue significativamente más lenta que en embriones salvajes, con un valor de **TM** (tiempo necesario para exportar a Sima del núcleo en el 50% de los embriones) más alto que el de los embriones control. Conforme va avanzado el desarrollo embrionario la diferencia entre las curvas (embriones homocigotas para *DfVHL* y embriones WT) fue haciéndose más notoria.

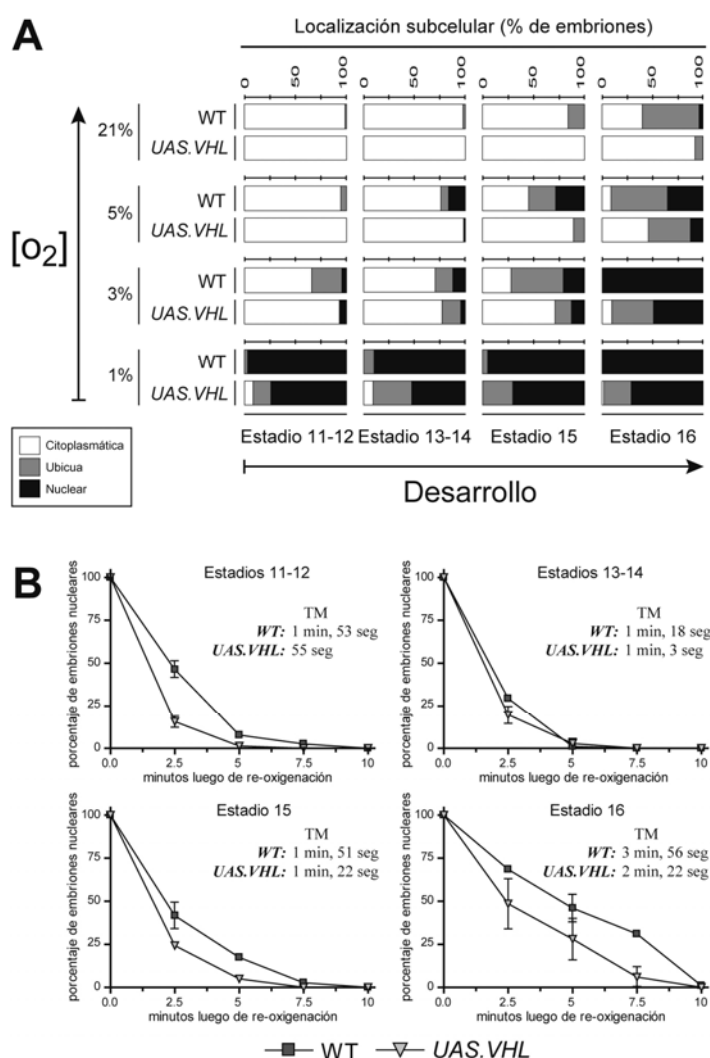
#### 2.d.3.b) Efecto de la ganancia de función de *VHL* sobre la localización subcelular de Sima.

Para generar líneas transgénicas que sobre-expresen VHL, fue necesario en primer lugar clonar la secuencia de *VHL* a partir del ADN genómico de embriones, río abajo del promotor *UAS* (*UAS.VHL*). Dado que no existen anticuerpos contra la proteína VHL, la expresión del transgén fue chequeada por hibridación in situ de mRNA (no mostrado).



Para analizar el efecto de la ganancia de función de *VHL* sobre la localización subcelular de *Sima*, generamos cromosomas recombinantes conteniendo a los elementos *UAS.sima* y *UAS.VHL*. Como se observa en la **Figura 48A**, los embriones que sobre-expresan *VHL* exhibieron un aumento en la localización citoplasmática de *Sima*, siendo más notorio este efecto en hipoxia que en normoxia (análisis estadístico en el **Apéndice 21**). Este experimento sugiere que niveles aumentados de la proteína *VHL* incrementan la localización citoplasmática de *Sima*.

A continuación, decidimos evaluar, mediante ensayos de re-oxigenación, si este aumento de la localización citoplasmática de *Sima* se debía a un incremento en la velocidad de exportación nuclear. La cinética de exportación de *Sima* en embriones que sobre-expresan *VHL* fue más rápida que en los embriones control (**Figura 48B**, gráfico de barras en el **Apéndice 22**, análisis estadístico en el **Apéndice 23**).



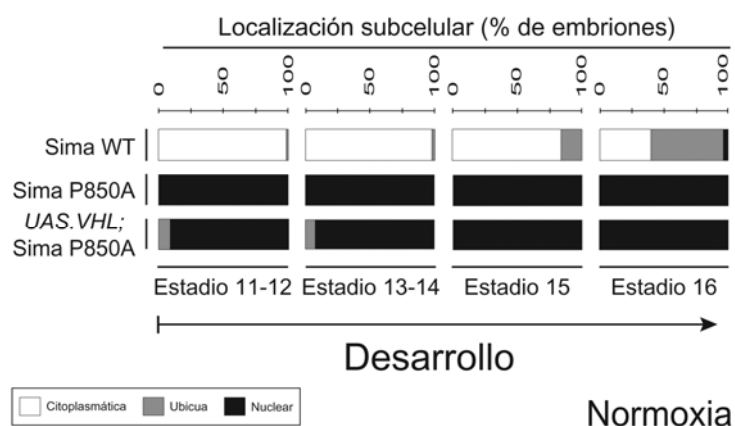
**Figura 48.** Localización subcelular de *Sima* en embriones que sobre-expresan *VHL*.

Efecto de la sobre-expresión de *VHL* sobre la localización subcelular de *Sima* en el equilibrio (**A**) o en ensayos de re-oxigenación (**B**), en distintos estadios del desarrollo embrionario. (**A**) Placas conteniendo embriones de distintos estadios del desarrollo fueron incubadas durante 4 horas a diferentes concentraciones de oxígeno, para luego analizar la localización de la proteína por inmunofluorescencia. Los embriones sobre-expresando *VHL* mostraron una localización más citoplasmática de *Sima* que los embriones control. (**B**) Los embriones fueron expuestos a una atmósfera de 1% de O<sub>2</sub> durante 4 horas, luego fueron transferidos a normoxia y fijados a diferentes tiempos para analizar la localización subcelular de *Sima* por inmunofluorescencia. La velocidad de exportación de *Sima* en embriones que sobre-expresan *VHL* fue más rápida que en embriones WT, sugiriendo fuertemente que niveles incrementados de *VHL* aumentan la velocidad de exportación de *Sima*.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que los niveles de *VHL* determinan la velocidad de exportación de *Sima*. Una vez establecido el requerimiento de *VHL* para la exportación de *Sima*, nuestro siguiente objetivo fue contestar si la exportación de *Sima* dependiente de *VHL* requiere la hidroxilación de la prolina 850.

2.d.3.c) VHL requiere de la hidroxilación de la prolina 850 para mediar la exportación de Sima.

Con el objeto de evaluar si la hidroxilación de Sima es una condición previa para la exportación mediada por VHL, analizamos el efecto de la sobre-expresión de *VHL* sobre la localización subcelular de SimaP850A en normoxia (**Figura 49**). La sobre-expresión de *VHL* no afectó la localización totalmente nuclear de SimaP850A, indicando que la hidroxilación de la prolina 850 es necesaria para la exportación de Sima mediada por VHL.



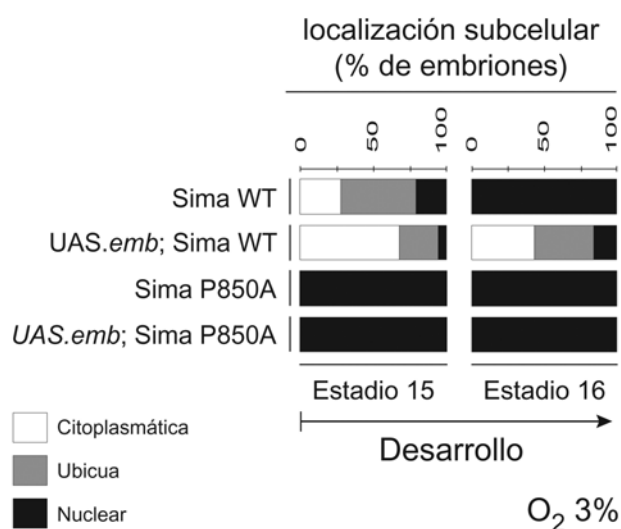
**Figura 49.** Para llevar a cabo su función en la exportación de Sima, VHL requiere de la previa hidroxilación de la de prolina 850. Efecto de la sobre-expresión de *VHL* sobre la localización subcelular de SimaP850A en normoxia. Placas conteniendo embriones de distintos estadios embrionarios fueron fijadas en normoxia, para luego analizar cuantitativamente la localización de la proteína por inmunofluorescencia. SimaP850A fue insensible a la sobre-expresión de VHL, manteniéndose totalmente nuclear aún en normoxia.

Dado que tanto *fatiga*, como *VHL* y la prolina 850 son necesarios para la exportación nuclear de Sima, concluimos que la maquinaria que regula la estabilidad proteica de HIF- $\alpha$ /Sima, controla también su localización subcelular. Anteriormente, habíamos determinado que la exportación nuclear de Sima está mediada por la exportina CRM1/Embargoed (**Figuras 38 y 40**). Decidimos por lo tanto evaluar si *Fatiga* y *VHL* son requeridas para la exportación nuclear de Sima mediada por CRM1/Embargoed.

#### 2.d.4) La exportación nuclear de Sima mediada por embargoed requiere de la previa hidroxilación de la prolina 850.

Como se mostró más arriba, la sobre-expresión de *embargoed* aumenta la velocidad de exportación nuclear de Sima (**Figura 40**), y además SimaP850A fue completamente nuclear aún en normoxia (**Figura 41E**). Basados en estas observaciones, analizamos si la prolina 850 es necesaria

para el aumento de la localización citoplasmática observado al sobre-expresar *embargoed* (Figura 50). La sobre-expresión de *embargoed* no mostró ningún efecto sobre la localización subcelular de SimaP850A, la cual se mantuvo totalmente nuclear (análisis estadístico en el Apéndice 24), sugiriendo que la hidroxilación de la prolina 850 es necesaria para que Embargoed pueda exportar del núcleo a Sima.



**Figura 50.** Embargoed requiere de la prolina 850 para exportar a Sima del núcleo. Efecto de la sobre-expresión de *embargoed* sobre la localización subcelular de SimaP850A en una atmósfera de 3% de oxígeno. Placas conteniendo embriones de distintos estadios embrionarios fueron fijadas, para luego analizar cuantitativamente la localización de SimaP850A por inmunofluorescencia. La localización subcelular de la proteína no se modificó al sobre-expresar *embargoed*, manteniéndose totalmente nuclear. Esto sugiere que la prolina 850 es necesaria para la exportación nuclear de Sima mediada por CRM1/Embargoed.

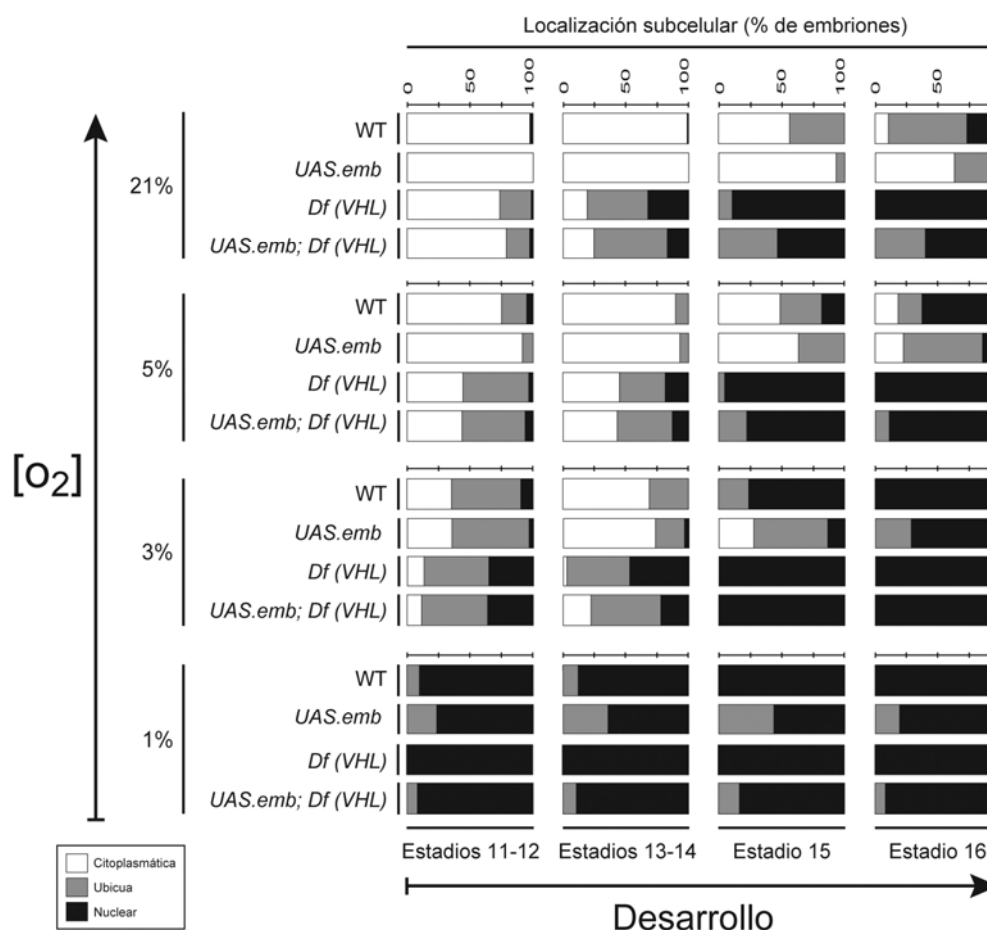
### 2.d.5) La actividad de VHL es necesaria para la exportación nuclear de Sima mediada por Embargoed.

Siguiendo el mismo razonamiento, nuestro siguiente objetivo fue analizar si VHL es también requerido para la exportación nuclear de Sima mediada por Embargoed. Por lo tanto, estudiamos si la sobre-expresión de *embargoed* es capaz de aumentar la localización citoplasmática de Sima en embriones homocigotas para la delección cromosómica *Df(2R)en-A* que incluye al gen VHL (denominada como *DfVHL*). Para poder realizar este experimento fue necesario obtener cuatro genotipos distintos de embriones:

- 1) *en.Gal4/UAS.sima*: embriones que sobre-expresan Sima.
- 2) *en.Gal4/UAS.sima; UAS.emb*: embriones que sobre-expresan Sima y también a Embargoed.
- 3) *en.Gal4/UAS.sima; DfVHL*: embriones mutantes homocigotas para VHL que sobre-expresan Sima.
- 4) *en.Gal4/UAS.sima; UAS.emb; DfVHL*: embriones mutantes homocigotas para VHL que sobre-expresan Sima y también a Embargoed.

Los tres primeros genotipos (1-3) corresponden a los controles necesarios y el genotipo 4 representa la condición a testear (4) (esquema de cruzamientos para obtener estos genotipos en el Apéndice 25). Analizamos por inmunofluorescencia la localización subcelular de Sima para cada uno de los genotipos, a distintos porcentajes de oxígeno y en distintos estadios del desarrollo

embrionario (**Figura 51**). No se observó un incremento significativo en la localización citoplasmática de Sima al sobre-expresar *embargoed* en los embriones homocigotas para *Df/VHL* (análisis estadístico en el **Apéndice 26**), sugiriendo fuertemente que CRM1/Embargoed requiere de la actividad de VHL para exportar a Sima del núcleo.

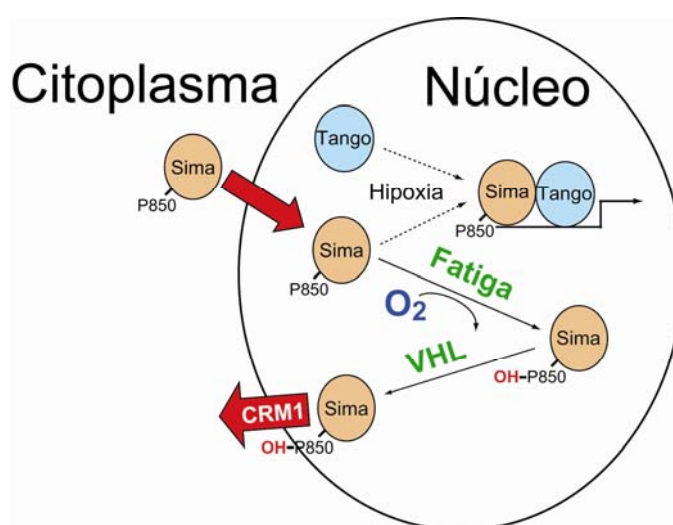


**Figura 51.** Embargoed requiere de la actividad de VHL para exportar a Sima del núcleo.

Análisis cuantitativo de la localización subcelular de Sima sobre-expresada en embriones: i) Controles, ii) Que sobre-expresan también Embargoed, iii) Mutantes homocigotas para *VHL* y iv) Que sobre-expresan también Embargoed y son mutantes homocigotas para *VHL*, en diferentes porcentajes de oxígeno y estadios del desarrollo embrionario. La localización subcelular de Sima en embriones que sobre-expresan Embargoed y son mutantes para *VHL* fue: **I**) Diferente a la observada en embriones WT y a la de embriones que sobre-expresan Embargoed y **II**) Similar a la observada en embriones homocigotas para *Df/VHL*, indicando que en ausencia de la proteína VHL, CRM1/Embargoed no puede exportar a Sima del núcleo.

Hasta aquí hemos demostrado que Sima presenta un movimiento continuo entre el núcleo y el citoplasma, el cual depende de los niveles de oxígeno, de parámetros del desarrollo embrionario y que la exportación está mediada por el receptor de exportación nuclear CRM1/Embargoed. Identificamos en la región C-terminal de la proteína una secuencia de localización nuclear (NLS) bipartita atípica que media la importación de Sima al núcleo. Encontramos además una señal de exportación nuclear (NES) dependiente de CRM1/Embargoed dentro del ODDD de Sima que

media su exportación hacia el citoplasma. Determinamos también, que la actividad de la prolin hidroxilasa Fatiga y de VHL son necesarias para la exportación nuclear mediada por Embargoed. Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren una secuencia de eventos que culminan con la exportación nuclear de Sima en presencia de oxígeno (**Figura 52**): Sima es hidroxilada por Fatiga en la prolina 850, permitiendo su interacción con VHL, y finalmente su exportación nuclear mediada por CRM1/Embargoed. En hipoxia la hidroxilación de la prolina 850 no tiene lugar, impidiendo su interacción con VHL, lo cual evita la ubiquitinación de Sima, su degradación en el proteasoma de 26S y su exportación nuclear. En consecuencia, la proteína se estabiliza en hipoxia y queda localizada en el núcleo.



**Figura 52.** Regulación de la localización subcelular de Sima por oxígeno.

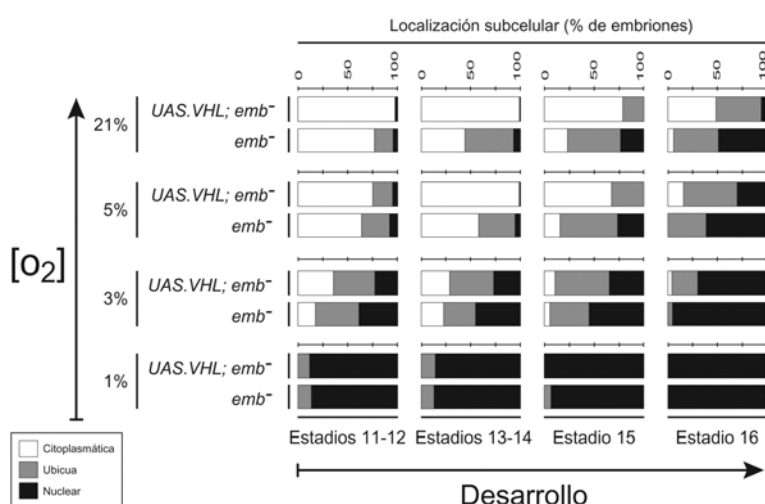
En **hipoxia** Sima se estabiliza y forma un hetero-dímero con Tango, induciendo la transcripción de genes blanco necesarios para la adaptación de las células a hipoxia. En presencia de oxígeno (**normoxia**) Fatiga promueve la hidroxilación de la prolina 850 de Sima. Este cambio post-traduccion permite la interacción de Sima con VHL, lo cual provoca que Sima sea exportada al citoplasma por el receptor de exportación nuclear CRM1/Embargoed.

Nos restaba definir si la función de Fatiga o de VHL sobre la localización subcelular de Sima ocurre solamente a través de CRM1/Embargoed o si además existe un mecanismo alternativo que contribuye a su exportación.

#### ***2.d.6) VHL regula la localización subcelular de Sima, también a través de un mecanismo independiente de Embargoed.***

Como se mostró más arriba, en embriones con pérdida de función de *embargoed* Sima presentó una cinética de exportación más lenta que en embriones WT en ensayos de re-oxigenación. Sin

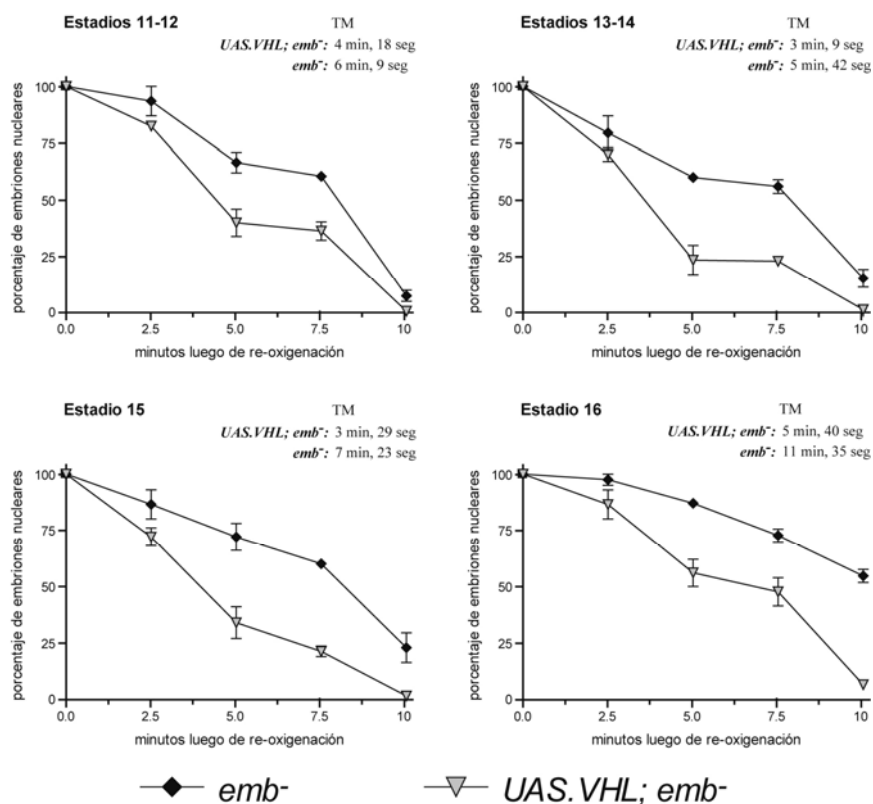
embargo, esta exportación no se inhibió completamente en los mutantes *embargoed* (Figuras 37 y 38), sugiriendo la existencia de un segundo mecanismo de exportación nuclear, independiente de Embargoed. Basados en esta observación, analizamos si el efecto sobre la localización de Sima observado al sobre-expresar *VHL* está exclusivamente mediado por Embargoed. A tal fin, analizamos la localización subcelular de Sima en embriones que sobre-expresan *VHL* y que a la vez son mutantes para *embargoed* y la comparamos con la de embriones mutantes para *embargoed* (esquema de cruzamientos en Apéndice 27). Por inmunofluorescencia, analizamos la localización subcelular de Sima a distintos porcentajes de oxígeno a lo largo del desarrollo embrionario (Figura 53). Estos embriones mostraron una localización de Sima más citoplasmática que la de embriones con pérdida de función de *embargoed* solamente, para la mayoría de las condiciones analizadas (análisis estadístico en el Apéndice 28), sugiriendo que el efecto sobre la localización subcelular de Sima observado tras sobre-expresar *VHL* no depende solamente de Embargoed.



**Figura 53.** VHL promueve la exportación de Sima también a través de un mecanismo independiente de Embargoed. Análisis cuantitativo de la localización subcelular de Sima sobre-expresada en embriones: i) Mutantes homocigotas para *embargoed* (trans-heterocigotas *emb<sup>k16715</sup>/Df(2L)N22-14*, deleción cromosómica que incluye al gen) y ii) Mutantes homocigotas para *embargoed* que además sobre-expresan VHL. La sobre-expresión de VHL en embriones mutantes para *embargoed* provocó que Sima se tornara más

citoplasmática que en los embriones mutantes del exportador que no sobre-expresan VHL.

Para obtener mayores evidencias de la existencia de este efecto, decidimos analizar la cinética de exportación de Sima en estos embriones, en ensayos de re-oxigenación. Como se muestra en la Figura 54 la sobre-expresión de VHL aceleró la exportación nuclear de Sima en embriones mutantes para *embargoed*, para todos los estadios del desarrollo analizados (análisis estadístico en el Apéndice 29).



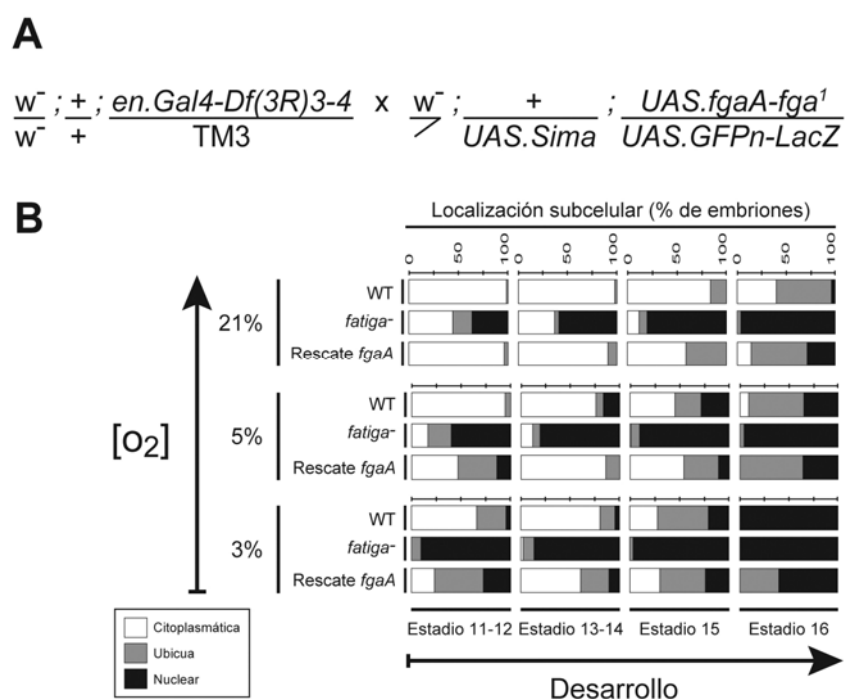
**Figura 54.** Efecto de la sobre-expresión de *VHL* sobre la localización subcelular de Sima en embriones con pérdida de función de *embargoed* en ensayos de re-oxigenación.

Embriones obtenidos a partir de los cruzamientos descritos en la **Figura 53** fueron expuestos a 1% de oxígeno durante 4 horas, luego fueron transferidos a normoxia y fijados a diferentes tiempos para analizar la localización subcelular de Sima por inmunofluorescencia. El gráfico muestra la proporción de embriones clasificados como nucleares a distintos tiempos luego de la re-oxigenación en distintos estadios del desarrollo. La velocidad de exportación de Sima en embriones con pérdida de función de *embargoed* que sobre-expresan *VHL* fue más rápida que la de embriones con pérdida de función de *embargoed* que no sobre-expresan *VHL*. Esto sugiere que *VHL* mediaría la exportación de Sima, también a través de un mecanismo independiente de *Embargoed*.

Estos resultados en conjunto sugieren fuertemente que la proteína *VHL* media la exportación nuclear de Sima a través de mecanismos dependientes y de mecanismos independientes de *Embargoed*.

## 2.e.) Un efecto curioso: La sobre-expresión de *FatigaA* incrementa la localización nuclear de Sima.

Como se mencionó más arriba, *FatigaB* rescató totalmente el efecto de la pérdida de función del gen *fatiga* sobre la localización de Sima (**Figura 44**). Encontramos que *FatigaA* en cambio revirtió la pérdida de función de *fatiga* sólo de manera parcial (**Figura 55**, análisis estadístico en el **Apéndice 30**).



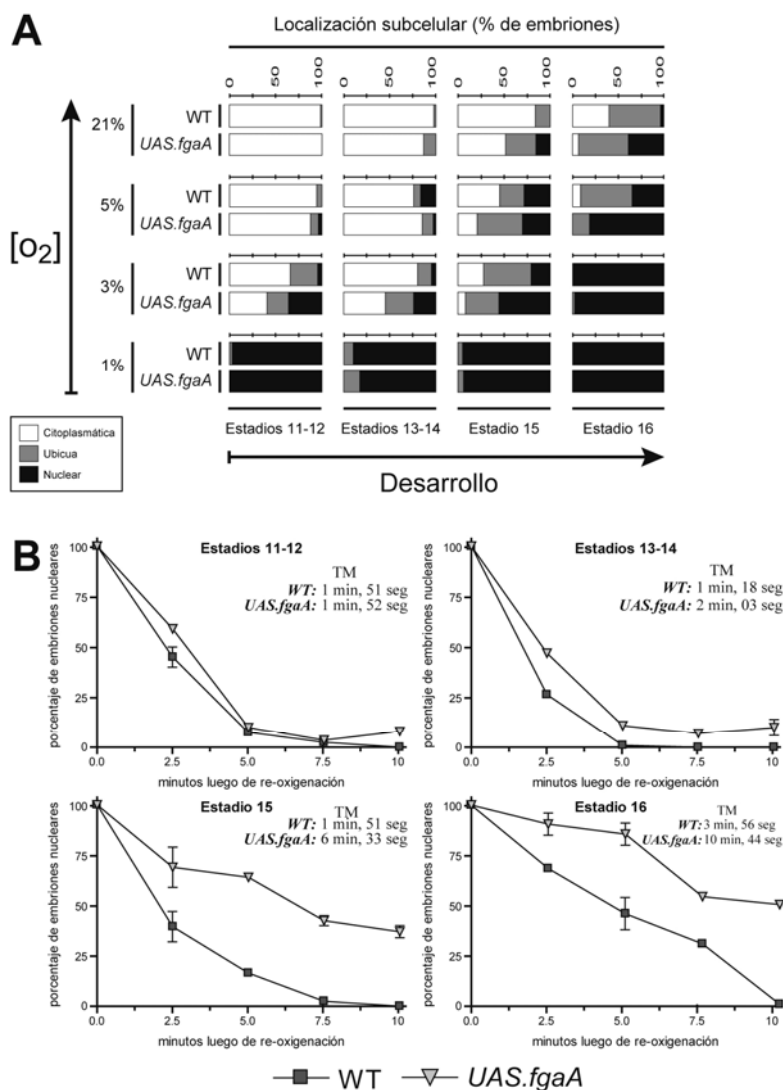
**Figura 55.** Rescate del fenotipo de pérdida de función de *fatiga* por sobre-expresión de FatigaA.

(A) Cruzamiento para intentar rescatar el fenotipo de pérdida de función de *fatiga* mediante la sobre-expresión de *fatigaA*. (B) Los embriones del genotipo indicado fueron expuestos a distintas concentraciones de oxígeno (21%, 5% y 3% de oxígeno), para luego realizar un análisis cuantitativo de la localización subcelular de Sima, por inmunofluorescencia. La localización de Sima en los embriones que sobre-expresan FatigaA se comparó con la localización en embriones WT y con embriones con pérdida de función de *fatiga*. La reversión del fenotipo de pérdida de función de *fatiga* por FatigaA fue parcial en todos los estadios del desarrollo, en las distintas concentraciones de oxígeno analizadas.

Decidimos por lo tanto evaluar el efecto de la sobre-expresión de *fatigaA* sobre la localización subcelular de Sima. Para ello, construimos una línea recombinante conteniendo los elementos *UAS.fatigaA* y *UAS.sima* en un mismo cromosoma y sobre-expresamos ambas proteínas con el inductor *en.Gal4*. Sorpresivamente, la sobre-expresión de *fatigaA* provocó que Sima se torne más nuclear que el control (**Figura 56A**, análisis estadístico en el **Apéndice 31**).

A continuación, analizamos si la sobre-expresión de *fatigaA* afecta directamente la exportación nuclear de Sima en ensayos de re-oxigenación, encontrando que sorpresivamente la exportación de Sima se volvió más lenta al sobre-expresar *fatigaA* (**Figura 56B**, gráfico de barras en el **Apéndice 32** y análisis estadístico en el **Apéndice 33**), presentando valores de TM más altos que para embriones WT (**Figura 56B**). Este resultado fue inesperado y sugeriría que FatigaA podría tener una función sobre el control de la localización subcelular de Sima afectando en parte su exportación nuclear.





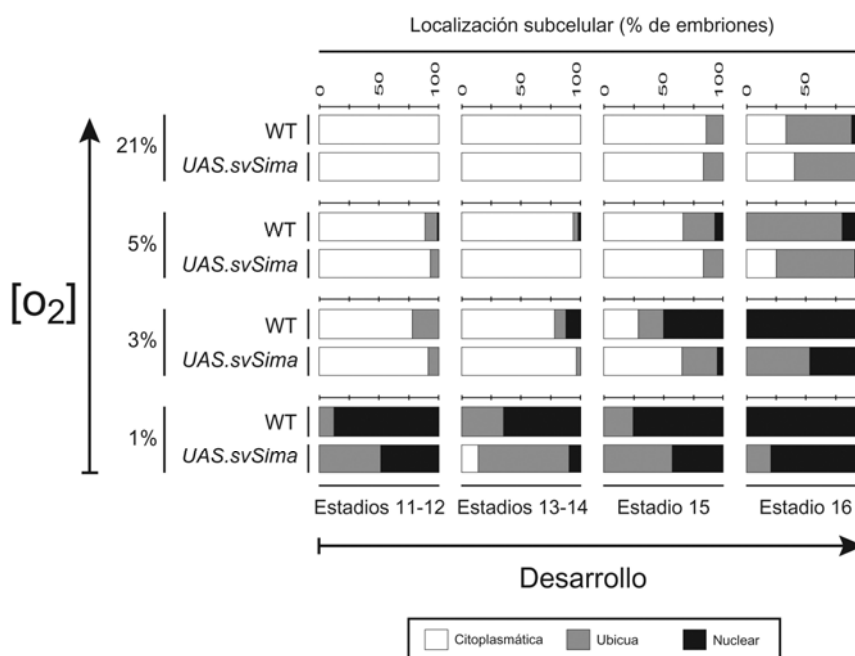
**Figura 56.** Localización subcelular de Sima en embriones que sobre-expresan *fatigaA*.

Efecto de la sobre-expresión de *fatigaA* sobre la localización subcelular de Sima en el equilibrio (**A**) o en ensayos de re-oxigenación (**B**), en distintos estadios del desarrollo. (**A**) Embriones con ganancia de función de *fatigaA* mostraron una localización de Sima más nuclear que en los controles, a diferentes niveles de oxígeno y estadios del desarrollo. (**B**) La velocidad de exportación de Sima en embriones que sobre-expresan *FatigaA* fue más lenta que en embriones WT en ensayos e re-oxigenación, con valores de tiempo medio (TM) significativamente mayores, necesitando por lo tanto más tiempo para exportar a Sima del núcleo en el 50% de los embriones.

## 2.f.) Splicing Alternativo de Sima: Efecto de una isoforma truncada de Sima sobre la localización subcelular de la proteína completa.

El gen *sima* incluye 12 exones y codifica al menos dos transcritos: una forma completa denominada **flSima** (“Full Length Sima”) y una variante corta **svSima** (“Splicing Variant of Sima”) (Gorr et al., 2004) (ver Introducción, **Figura 14**). A partir de resultados obtenidos en células S2, se postuló que svSima competiría por Tango con flSima, evitando la formación de un heterodímero productivo, dando lugar por lo tanto a un efecto de dominante negativo sobre la actividad transcripcional de flSima (Gorr et al., 2004). En mamíferos se demostró la interacción directa entre la proteína HIF- $\alpha$  y la proteína IPAS, homólogos de flSima y svSima respectivamente, generando un complejo improductivo (Makino et al., 2001). Decidimos por lo tanto evaluar si la forma truncada svSima posee además una función sobre la localización subcelular de la forma completa de Sima en embriones.

Clonamos el ADN copia de *svSima* (cedido gentilmente por el Dr. Thomas Gorr de la Universidad de Zurich), río abajo del promotor UAS y generamos la construcción *UAS.svSima*, con la cual producimos líneas transgénicas. Dado a que actualmente no existe un anticuerpo específico contra *svSima* y que además, el anticuerpo empleado para reconocer *flSima* no la detecta, recombinamos el elemento *UAS.svSima* con *UAS.sima* en un mismo cromosoma, para que de esta manera todos los embriones que sobre-expresan *flSima* también expresen *svSima*. Como se muestra en la **Figura 57**, la sobre-expresión de *svSima* provocó que *flSima* fuera más citoplasmática que en los controles que expresan *flSima* solamente. Este efecto fue especialmente notable a bajos niveles de oxígeno y pudo ser verificado en todos los estadios del desarrollo analizados (análisis estadístico en **Apéndice 34**).



**Figura 57.** Localización subcelular de *flSima* en embriones con ganancia de función de *svSima*.

Los embriones, que co-expresan la forma completa de *Sima* (**flSima**) y la variante de splicing (**svSima**) en distintos estadios del desarrollo embrionario, fueron incubados por 4 horas a diferentes concentraciones de oxígeno, para luego analizar la localización subcelular de *flSima* por inmunofluorescencia. A bajos niveles de oxígeno los embriones que sobre-expresan *svSima* mostraron una localización más citoplasmática de *flSima* en comparación con embriones que expresan *flSima* solamente.

Este resultado sugiere que *svSima*, proteína con localización citoplasmática (Gorr et al., 2004), interfiere con la entrada de *flSima* al núcleo.

## **DISCUSIÓN**

## 1. La degradación de Sima está mediada por la hidroxilación de un residuo de prolina.

En humanos la respuesta transcripcional a hipoxia está mediada por el factor de transcripción HIF-1, un heterodímero compuesto por dos subunidades, alfa y beta, pertenecientes a la familia de proteínas bHLH-PAS. La subunidad beta se expresa constitutivamente y no está sujeta a regulación por oxígeno (Huang et al., 1996; Pugh et al., 1997). En cambio, la subunidad alfa está controlada de manera oxígeno-dependiente a nivel de su destrucción en el proteasoma de 26S (Jiang et al., 1997; Pugh et al., 1997). En presencia de oxígeno HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado por prolin hidroxilasas (**PHD**) - enzimas que utilizan al oxígeno molecular como co-sustrato- en dos residuos de prolina (P402 y P564) dentro del dominio ODDD, lo que determina su posterior ubiquitinación dependiente de VHL y degradación en el proteasoma 26S (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Masson et al., 2001). Al disminuir los niveles de oxígeno las PHDs son menos activas y por consiguiente HIF-1 $\alpha$  no es hidroxilado, escapando a su degradación proteasomal.

En *Drosophila* se identificaron a las proteínas bHLH-PAS Similar (Sima) y Tango como los homólogos funcionales de HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  de mamíferos (Lavista-Llanos et al., 2002; Nagao et al., 1996). De manera similar a lo observado para mamíferos, solamente Sima presentó un cambio en su estabilidad proteica en función de los niveles del oxígeno, mientras que la expresión de Tango es constitutiva (Lavista-Llanos et al., 2002). Asimismo, identificamos a la prolin hidroxilasa que funciona como sensor de oxígeno en *Drosophila*, a la cual hemos denominado *fatiga*. La pérdida de función de este gen da lugar a niveles constitutivamente aumentados de Sima (Lavista-Llanos et al., 2002).

En esta tesis identificamos, basándonos en similitudes de secuencias, un dominio central de 200 aminoácidos, homólogo al ODDD de HIF-1 $\alpha$ , del cual depende la degradación de Sima en normoxia. Además, encontramos que dicha degradación en presencia de oxígeno depende de la prolina 850 localizada dentro del ODDD de Sima. Tanto la delección del ODDD como la mutación en dicha prolina no sólo estabilizó a la proteína, sino que provocó un aumento en su actividad transcripcional. Estos resultados son consistentes con un modo conservado de regulación de la degradación de Sima, la cual depende de la hidroxilación de residuos de prolina.

## 2. Sistema experimental para analizar la localización subcelular de Sima en embriones de *Drosophila*.

La rápida degradación de HIF-1 $\alpha$ /Sima en normoxia provoca que el análisis de la localización subcelular de estas proteínas sea una tarea complicada. Por lo tanto, la estrategia experimental para el estudio de la localización subcelular debe ser tal que permita obtener altos niveles de la proteína, superando de esta manera su degradación, sin afectar la fisiología de las células.

Varias estrategias han sido utilizadas en mamíferos para estabilizar a HIF-1 $\alpha$  en normoxia:

1. Interferir con su degradación proteasómica, empleando inhibidores específicos del proteasoma de 26S. El inconvenientes de estas drogas es que presentan efectos colaterales que, según se ha descrito, afectan la fisiología celular. En células de mamífero se observó la acumulación nuclear de HIF-1 $\alpha$  en normoxia en presencia de estos inhibidores (Groulx and Lee, 2002; Hur et al., 2001), la cual podría deberse a dichos efectos colaterales. Otra desventaja de estos inhibidores es que pueden utilizarse únicamente en experimentos con células en cultivo y no en organismos completos.
2. Sobre-expresarse la proteína con el objetivo de superar la tasa de degradación proteasómica. En la literatura se han descritos dos formas de sobre-expresarse HIF-1 $\alpha$  en células de mamíferos. En el primer caso, se utilizó el sistema de tetraciclina para inducir la sobre-expresión de HIF, el cual se localizó constitutivamente en el núcleo de manera independiente del oxígeno (Hofer et al., 2001). En el segundo caso, se utilizó el promotor de citomegalovirus para sobre-expresarse de manera constitutiva a HIF-1 $\alpha$ , independizándose del agregado de sustancias exógenas para inducir la expresión (Kallio et al., 1998). Los autores encontraron que la proteína se acumulaba en el citoplasma en normoxia y en hipoxia apareció enriquecida en el núcleo, sugiriendo la existencia de una regulación de la localización subcelular de HIF-1 $\alpha$  en función de los niveles de oxígeno. Nuestra interpretación es que en los experimentos en que la sobre-expresión está mediada por tetraciclina, dicha droga provoca stress en las células, lo cual conduce a la acumulación de Sima en el núcleo.

En esta tesis realizamos estudios de localización subcelular de Sima en embriones de *Drosophila* sobre-expresando a la proteína mediante el sistema binario de levaduras Gal4/UAS. En nuestros experimentos la transcripción de Sima estaba controlada en última instancia por el promotor del gen *engrailed*. Este sistema de sobre-expresión presenta dos ventajas:

1. El empleo de un promotor endógeno de *Drosophila* como inductor de la sobre-expresión de Sima lo cual no genera stress celular, permitiendo el normal desarrollo del embrión.
2. No observamos saturación de ninguno de los pasos bioquímicos en estudio (importación/exportación nuclear). En ciertos experimentos descritos en esta tesis Sima apareció acumulada en el citoplasma, mientras que en otros apareció exclusivamente localizada en el núcleo. La saturación de alguno de los pasos de la importación o exportación habría provocado la acumulación parcial de Sima en el compartimiento “incorrecto”.

### 3. La localización subcelular de Sima es el resultado de un equilibrio dinámico entre importación y exportación nuclear.

En mamíferos se ha propuesto un modelo estático para la regulación de la localización subcelular de HIF-1 $\alpha$ , el cual considera que en normoxia la proteína se localiza en el citoplasma, mientras que la exposición a condiciones de hipoxia provoca que la proteína sea importada al núcleo (Berra et al., 2001; Chilov et al., 1999; Luo and Shibuya, 2001). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que HIF-1 $\alpha$  también podría estar sujeto a exportación nuclear. La acumulación nuclear dependiente de hipoxia de una quimera GFP-HIF-1 $\alpha$  fue revertida al regresar a las células a normoxia en presencia de un inhibidor de la síntesis proteica (cicloheximida). Este resultado sugiere que la reversión de la localización subcelular no se debe a una importación nuclear ineficiente de la proteína sintetizada de *novio*, sino a la exportación nuclear de la proteína que previamente había sido importada al núcleo durante la hipoxia (Kallio et al., 1998). Esta observación junto a otras evidencias permitieron postular que la localización de HIF-1 $\alpha$  estaría determinada por la conjugación de varios mecanismos, en los que se incluyen importación y exportación nuclear de la proteína (Fabbro and Henderson, 2003; Groulx and Lee, 2002)}.

A lo largo de esta tesis estudiamos el mecanismo que controla la localización subcelular de Sima en embriones, contribuyendo por lo tanto a la comprensión de este mecanismo de regulación de HIF. Nuestros resultados sugieren fuertemente que la localización subcelular de Sima depende de un equilibrio dinámico entre importación y exportación nuclear, en el que ambos procesos ocurren simultáneamente. Experimentos tanto genéticos como farmacológicos en donde se evita ya sea la importación o la exportación nuclear dan como resultado una localización de Sima aberrante. El movimiento de Sima continuo entre el núcleo y el citoplasma dependería de un mecanismo activo, el cual modularía la tasa relativa de importación versus exportación nuclear en función de la concentración de oxígeno y de parámetros del desarrollo embrionario. Encontramos que el oxígeno varía la relación entre importación y exportación nuclear de la proteína de manera dependiente de dosis, alterando así el equilibrio en la localización subcelular de la proteína; conforme descienden los niveles de oxígeno Sima presenta una localización más nuclear. De este modo, la localización de Sima predominantemente citoplasmática en normoxia se debe, al menos en parte, a una rápida exportación nuclear que sobrepasa la tasa de importación al núcleo.

Hemos caracterizado a nivel molecular tanto el proceso de importación como el de exportación nuclear. El ingreso de Sima al núcleo es dependiente de una NLS bipartita no canónica localizada en su extremo C-terminal, la cual presenta una separación atípica de 14 aminoácidos entre las dos regiones básicas, en lugar de los 10 aas usuales en las NLSs bipartitas clásicas. Tanto la posición como la estructura de la NLS funcional de Sima están conservadas en HIF- $\alpha$  de mamíferos, ya que la NLS funcional de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  se encuentra localizada en el extremo C-terminal y es del

tipo bipartita atípica, con una separación que también en estos casos es mayor a 10 aminoácidos entre las dos regiones básicas (Luo and Shibuya, 2001).

Hemos demostrado también que el proceso de exportación nuclear de Sima depende en parte del receptor de exportación nuclear CRM1/Embargoed (**Figura 52**). Experimentos de pérdida y ganancia de función de *CRM1* mostraron que la proteína es continuamente exportada al citoplasma en normoxia: embriones mutantes para *CRM1* mostraron a Sima acumulada en el núcleo, mientras que la sobre-expresión de CRM1 promovió un aumento de la localización citoplasmática de Sima. Observamos además que los efectos de la pérdida y la ganancia de función de *CRM1/Embargoed* sobre la localización subcelular de Sima serían dependientes del nivel de oxígeno (ver más adelante). Asimismo, identificamos una señal de exportación nuclear (**NES**) dependiente de CRM1/Embargoed que mapea dentro del ODDD de Sima y contribuye a su exportación nuclear. En nuestro laboratorio la Lic. Nuria Romero identificó además dos NESs dentro de Sima, que se localizan en el dominio bHLH, las cuales estarían conservadas entre las proteínas de la familia bHLH-PAS (Nuria Romero et al., manuscrito enviado). La existencia de varias NESs en una misma proteína, en regiones distantes dentro de la secuencia ha sido descrita en proteínas que presentan un movimiento continuo entre el núcleo y el citoplasma. Por ejemplo, p53 tiene dos NESs dependientes de CRM1, una localizada dentro del dominio que regula su estabilidad en el extremo C-terminal y la segunda en la región N-terminal (Stommel et al., 1999; Zhang and Xiong, 2001).

#### 4. La localización subcelular de Sima depende de parámetros del desarrollo.

En esta tesis encontramos que la localización subcelular de Sima se encuentra bajo influencia de parámetros del desarrollo embrionario. Los embriones de estadios tempranos mostraron tendencia a una mayor localización citoplasmática de Sima, y la proteína requirió condiciones de hipoxia más severas para alcanzar una completa localización nuclear. Este efecto del desarrollo sobre la localización subcelular de Sima pudo ser observada en diversos experimentos realizados a lo largo de esta tesis.

Así por ejemplo, en embriones con pérdida de función de *CRM1/embargoed* observamos que Sima fue siendo más nuclear conforme avanza el desarrollo embrionario, para todos los porcentajes de oxígeno analizados. De la misma manera, en ensayos de re-oxigenación la velocidad de exportación de Sima del núcleo fue menor en estadios más avanzados del desarrollo. Estos datos sugieren que la exportación de Sima podría estar regulada por parámetros del desarrollo.

Trabajos realizados por Roth y colaboradores (2003) demostraron que la proteína DNup88 (“Members Only”) regula negativamente a la exportación mediada por CRM1/Embargoed. Los autores proponen que el rol de DNup88 es atenuar la función del exportador CRM1, mediante el anclaje de esta última a la membrana nuclear. La expresión de DNup88 es dinámica y se encuentra regulada a lo largo del desarrollo embrionario. En embriones jóvenes la proteína está ausente permitiendo una activa exportación nuclear mediada por CRM1; conforme avanza el desarrollo, la

expresión de DNup88 se va incrementando, lo que provoca que la actividad de CRM1 sea gradualmente inhibida (Roth et al., 2003).

## **5. El equilibrio dinámico entre importación y exportación nuclear de Sima depende del sistema prolil hidroxilasa/VHL.**

Varios estudios demostraron que el oxígeno regula la localización subcelular de HIF-1 $\alpha$  en células de mamíferos. La proteína se encuentra localizada en el citoplasma en normoxia y en el núcleo en hipoxia (Berra et al., 2001; Kallio et al., 1998; Luo and Shibuya, 2001). La fuerte actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  observada cuando se deleciona su dominio ODDD (Elson et al., 2001) o al inactivar VHL (Masson et al., 2001; Maxwell et al., 1999) es consistente con el rol de estos elementos en la localización citoplasmática de HIF-1 $\alpha$  en normoxia; sin embargo, esta hipótesis no fue nunca considerada en la literatura.

Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis demuestran que la prolina 850, residuo clave para la degradación de Sima en normoxia, también está involucrado en la regulación de su localización subcelular. Consistente con esto, la hidroxilación de este residuo mediada por Fatiga es requerida para la localización citoplasmática de Sima en presencia de oxígeno.

Demostramos además que la actividad de la proteína VHL es necesaria no sólo para regular la degradación de Sima sino también para el control de su localización subcelular de manera dependiente del oxígeno. Altos niveles de VHL alteran el equilibrio hacia una localización de Sima más citoplasmática, mientras que bajos niveles de VHL lo hacen a favor de una localización de Sima más nuclear. Posteriormente, determinamos que la hidroxilación de la prolina 850 mediada por Fatiga es requerida para la función de VHL, lo que incrementa la localización citoplasmática de Sima.

Estos resultados en conjunto permiten postular que la maquinaria involucrada en la ubiquitinación de HIF- $\alpha$ /Sima es también necesaria para la regulación de su localización subcelular. La actividad de las proteínas de la maquinaria de degradación modificaría la relación entre la importación y la exportación nuclear de HIF- $\alpha$ /Sima, de una manera dependiente del oxígeno.

## **6. La exportación nuclear de Sima está regulada por el oxígeno.**

Una vez establecido que VHL y Fatiga, a través de la hidroxilación de la prolina 850, pueden favorecer la localización citoplasmática de Sima variando la relación entre importación y exportación nuclear de la proteína, nuestro siguiente objetivo fue definir cuál de estos dos procesos (importación o exportación) está bajo el control del sistema prolil hidroxilasa/VHL.

Los ensayos de re-oxigenación permitieron analizar la regulación de la localización subcelular de Sima en una situación dinámica, donde a tiempos cortos luego de la re-oxigenación la contribución de la exportación nuclear sobre la localización de Sima es el componente más



importante. Embriones mutantes homocigotas para *CRM1/Embargoed* Sima presentaron una velocidad de exportación nuclear mucho menor que los embriones WT. Al sobre-expresar *CRM1/Embargoed* la exportación nuclear de Sima fue más rápida que la de los embriones control.

Los experimentos tanto de pérdida como de ganancia de función de *fatiga* o de *VHL* en ensayos de re-oxigenación sugieren que el sistema prolil hidroxilasa/*VHL* es necesario para la exportación nuclear mediada por *Embargoed*. Esta idea se vio reforzada por el hecho de que la pérdida de función de *VHL* o la forma mutante de Sima en la que la prolina 850 fue reemplazada por una alanina, provocaron un aumento en la localización nuclear de Sima, la cual no pudo ser alterada por la sobre-expresión de *Embargoed*. Estos resultados permiten postular que la maquinaria involucrada en la degradación de *HIF- $\alpha$ /Sima* controla también su localización subcelular, regulando su exportación nuclear dependiente de *CRM1/Embargoed* (**Figura 52**).

## 7. Otros mecanismos que regulan la localización subcelular de Sima.

En la literatura aparecen cada vez más trabajos reportando que la localización subcelular de proteínas, que presentan un movimiento continuo entre el núcleo y el citoplasma dependiente de estímulos externos, está determinada por la confluencia de varios mecanismos celulares simultáneos que afectan a la importación y/o la exportación (Fabbro and Henderson, 2003; Reguly and Wrana, 2003). La presencia del estímulo externo modifica la actividad de algunos de estos mecanismos celulares, alterando en consecuencia el balance entre la velocidad de importación y la de exportación, lo que provoca en última instancia un cambio en la proporción de proteína localizada en uno u otro compartimiento. Para el caso de *HIF-1 $\alpha$* , también se ha postulado que varios sistemas convergen en la regulación de su localización subcelular en función del oxígeno (Fabbro and Henderson, 2003). A favor de esta hipótesis, existen evidencias que sugieren que *HIF-1 $\alpha$*  es exportado del núcleo tanto por mecanismos dependientes de *CRM1* (Berra et al., 2001) como independientes de este exportador (Groulx and Lee, 2002).

Nuestros resultados mostraron que la exportación nuclear de Sima por *CRM1/Embargoed* es dependiente del sistema prolil hidroxilasa/*VHL*. Sin embargo, dicho sistema aparentemente cumple otra función sobre la localización subcelular de Sima, además de la mediada por *CRM1/Embargoed*. A pesar de que la exportación nuclear de Sima apareció disminuida en embriones mutantes para *CRM1/embargoed* con respecto a embriones control, dicha exportación no se encontraba completamente inhibida, sugiriendo la existencia de un segundo mecanismo que regula la localización subcelular de Sima de manera independiente de *CRM1/Embargoed*. En concordancia con esta hipótesis, en embriones con pérdida de función de *fatiga* o de *VHL*, Sima presentó una localización más nuclear que la observada en embriones mutantes para *CRM1/embargoed*. Para obtener evidencia directa del efecto del sistema prolil hidroxilasa/*VHL* sobre este segundo mecanismo de exportación nuclear, decidimos evaluar el efecto de la sobre-

expresión de VHL en embriones mutantes para *CRM1/embargoed*. Estos embriones mostraron una velocidad de exportación nuclear de Sima significativamente más rápida que la de los embriones mutantes para *embargoed* que no sobre-expresan VHL.

Estos experimentos en conjunto sugieren que la proteína VHL regularía la localización subcelular de Sima empleando un segundo mecanismo de exportación nuclear que sería independiente de CRM1/Embargoed. Estos mecanismos de exportación, el uno dependiente y el otro independiente de CRM1/Embargoed, cooperarían para asegurar una rápida exportación de Sima al citoplasma en condiciones de re-oxigenación.

La localización subcelular del receptor de aril hidrocarburos (**Ahr**, receptor de dioxinas), proteína de la familia bHLH-PAS, está controlada por un sistema totalmente diferente. La proteína sufre retención en el citoplasma, de manera dependiente de un complejo que incluye a la chaperona Hsp90 (“**H**eat **S**hock **P**rotein 90”) (Carver et al., 1994; Kazlauskas et al., 2001; Pongratz et al., 1992; Whitelaw et al., 1995). El dominio PAS de Ahr incluye tanto la región de interacción con el ligando xenobiótico (Coumailleau et al., 1995; Whitelaw et al., 1995), como la que media la interacción con la chaperona Hsp90 (Whitelaw et al., 1995). En ausencia del ligando, Ahr se encuentra retenido en el citoplasma en un estado inactivo; cuando el ligando interacciona con el receptor, este último sufre un cambio conformacional que lo disocia del complejo que lo retiene en el citoplasma, lo que determina su importación al núcleo y la dimerización con Arnt/HIF-1 $\beta$ .

Se ha demostrado la interacción directa entre la chaperona citosólica Hsp90 y el dominio PAS de HIF- $\alpha$  (Gradin et al., 1996; Katschinski et al., 2002; Minet et al., 1999), sugiriendo que el complejo Hsp90 tal vez medie su retención citoplasmática en normoxia. A bajos niveles de oxígeno HIF- $\alpha$  podría sufrir cambios conformacionales que eviten dicha retención. Serán necesarios estudios en el futuro para definir si esta chaperona participa en la regulación de la localización subcelular de HIF- $\alpha$ /Sima y cuál es su relación con los niveles de oxígeno.

## **8. Compartimentalización y función de las prolil hidroxilasas.**

El hecho de que la acción de VHL sobre el residuo de hidroxiprolina de Sima es necesaria para su exportación nuclear sugiere que Sima hidroxilada debería estar presente en el núcleo. En favor de esta hipótesis, se ha reportado la presencia de prolil hidroxilasas en el núcleo en discos imaginales de *Drosophila* (Frei and Edgar, 2004). A pesar de que esto no fue investigado en esta tesis, en mamíferos se ha demostrado que la hidroxilación en prolinas de HIF- $\alpha$  ocurre tanto en el citoplasma como en el núcleo. Extractos citoplasmáticos o nucleares de células de mamíferos presentan actividad de prolil hidroxilasa in vitro sobre prolinas del ODDD de HIF-1 $\alpha$  (Marxsen et al., 2004). Además, se demostró que la degradación dependiente de oxígeno de HIF-1 $\alpha$  en el proteasoma de 26S ocurre tanto en el citoplasma como en el núcleo, observándose en ambos compartimientos idéntica vida media de HIF-1 $\alpha$  (Berra et al., 2001). Estudios realizados por

Groulx y Lee (2002) reportaron que la degradación de HIF-1 $\alpha$  luego de re-oxigenar las células está iniciada por la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$  en prolinas, la cual ocurriría dentro del núcleo.

En mamíferos se encontraron hasta ahora tres isoformas de las PHDs de HIF- $\alpha$ , que presentan afinidades diferentes por las prolinas de HIF- $\alpha$  (Masson et al., 2001), mostrando la PHD2 la mayor actividad hidroxilasa sobre HIF-1 $\alpha$  (Berra et al., 2003; Huang et al., 2002; Metzen et al., 2003). Si bien se analizó la localización subcelular de estas tres isoformas de PHDs, este punto es todavía controversial. Está claro sin embargo, que al menos una de las 3 isoformas está localizada en el núcleo (Huang et al., 2002; Metzen et al., 2003).

PHD2 presenta un dominio exclusivo de interacción proteína/proteína denominado “MYND”. Como se mencionó en la introducción, las proteínas que contienen este dominio se unen a factores de transcripción, reprimiendo su actividad transcripcional. El Dr. Lázaro Centanin identificó en nuestro laboratorio tres isoformas del homólogo funcional de las PHDs en *Drosophila*: FatigaA, FatigaB y FatigaC, siendo FatigaA la que contiene el dominio MYND y es por lo tanto similar a PHD2, mientras que FatigaB y FatigaC serían semejantes a PHD3 (Lázaro Centanin 2006, tesis doctoral). FatigaB es capaz de rescatar distintos fenotipos de pérdida de función de *fatiga*, tales como la localización subcelular de Sima (en esta tesis) y el correcto vaciado de traqueas al final de la embriogénesis (Lázaro Centanin 2006, tesis doctoral). Fatiga A fue capaz de rescatar estos fenotipos sólo parcialmente.

En concordancia con estos datos, la sobre-expresión de FatigaB provocó un aumento en la velocidad de exportación de Sima en ensayos de re-oxigenación para estadios tempranos del desarrollo. Sin embargo, de manera llamativa en los embriones que sobre-expresan FatigaA Sima presentó una localización más nuclear que la de embriones control, es decir, un efecto contrario al esperado. Consiste con esto, en ensayos de re-oxigenación encontramos que la sobre-expresión de FatigaA provocó una disminución en la velocidad de exportación nuclear de Sima en todos los estadios analizados. FatigaA, a diferencia de las otras isoformas, contiene el dominio MYND. Interesantemente, en todos los organismos en los que se han descrito prolil-hidroxilasas que modifican a HIF- $\alpha$  (EGL-9 en *C. elegans*, FatigaA en *Drosophila*, y PHD2 en mamíferos) existen al menos una isoforma con dominio MYND.

Lázaro Centanin encontró dos secuencias consenso en la proteína Sima que unirían un dominio MYND. En función de estos datos, se puede especular sobre una posible función de PHD2/FatigaA sobre la localización subcelular de HIF- $\alpha$ /Sima en la que el dominio MYND participaría de manera independiente de su actividad prolil hidroxilasa. En este sentido, se reportó recientemente que PHD2 puede funcionar como represor transcripcional de HIF- $\alpha$  de un modo independiente de su dominio prolil hidroxilasa (To and Huang, 2005). Por otra parte, la sobre-expresión de PHD2 sin el dominio MYND causó una gran reducción en la estabilidad de HIF- $\alpha$  que fue mucho mayor que la provocada por PHD2 WT, indicando que el dominio MYND inhibiría

la actividad catalítica de PDH2 (Choi et al., 2005). Serán necesarios estudios adicionales para evaluar si el efecto de la sobre-expresión de FatigaA sobre la localización subcelular de Sima se debe exclusivamente al dominio MYND.

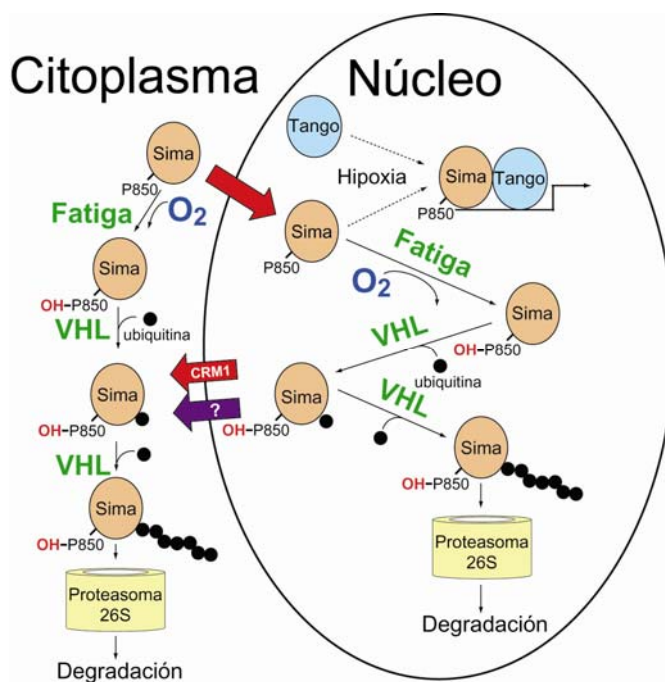
## **9. Ubiquitinación y la función dual de VHL.**

Por mucho tiempo se pensó que la ubiquitinación de un sustrato conducía indefectiblemente a su degradación en el proteasoma. Durante los últimos quince años, sin embargo, se han ido acumulando “excepciones” a esta regla, conociéndose hoy en día distintos procesos celulares “no canónicos” en los cuales esta molécula se encuentra involucrada (Glickman and Ciechanover, 2002). Ejemplos de ello son el requerimiento de ubiquitina para la endocitosis de receptores de membrana (Shih et al., 2000; Strous and Govers, 1999), la reparación post-replicativa del ADN (Spence et al., 1995), cambios en la localización subcelular de factores de transcripción (Yu et al., 2000) y otros.

En la literatura existen ejemplos en los cuales proteínas nucleares necesitan ser exportadas al citoplasma como paso previo a su degradación en el proteasoma de 26S. Ejemplos de estos son el factor supresor de tumores p53 y los reguladores del ciclo celular P27 y CiclinaD. (Scheffner, 1999). En células normales p53 es rápidamente degradado en el proteasoma de 26S, en un proceso dependiente de su ubiquitinación mediada por la ubiquitin ligasa Mdm2. En cambio, en células estresadas esta modificación post-traducciona no tiene lugar, permitiendo la estabilización de p53. Por otra parte, p53 está regulado a nivel de su localización subcelular: la proteína es importada al núcleo de manera constitutiva, siendo rápidamente exportada hacia el citoplasma en condiciones normales. La exportación nuclear de p53 está mediada por CRM1 y depende de dos NESs, una localizada en el extremo N-terminal de la proteína (Zhang and Xiong, 2001) y la otra en la región C-terminal (Stommel et al., 1999). Se demostró que la exportación nuclear de p53 mediada por Mdm2 depende de una serie de cambios conformacionales inducidos por la ubiquitinación de p53 que conllevan la activación de sus NESs (Boyd et al., 2000; Geyer et al., 2000; Gu et al., 2001; Yu et al., 2000). Cuando la célula está en condiciones de stress, este cambio conformacional no tiene lugar, lo cual determina que p53 sea estable y quede localizada en el núcleo debido a que su exportación nuclear está inhibida por ocultamiento de las NESs (Stommel et al., 1999). La proteína Mdm2, en función de sus niveles intracelulares, puede catalizar tanto la mono- como la poli-ubiquitinación de p53; llamativamente, la mono-ubiquitinación promueve la exportación nuclear de p53, mientras que la poli-ubiquitinación conduce a su degradación en el proteasoma de 26S (Li et al., 2003).

Nuestros resultados sugieren que el sistema proil hidroxilasa/VHL controla la exportación nuclear de Sima de manera dependiente del oxígeno. Queda por definir si la exportación nuclear de HIF- $\alpha$ /Sima requiere la ubiquitinación previa de la proteína. Groulx y Lee (2002) demostraron que luego de re-oxigenar a células de mamíferos aparecen en primer lugar formas mono-ubiquitinadas

de HIF- $\alpha$  en el núcleo y en segundo lugar observaron formas poli-ubiquitinadas tanto en el núcleo como en el citoplasma. Los autores proponen que formas ubiquitinadas de HIF- $\alpha$  son exportadas al citoplasma previamente a su degradación en el proteasoma de 26S. Estas evidencias permiten especular sobre la existencia de un mecanismo que podría regular la degradación y la localización subcelular de HIF- $\alpha$ /Sima de manera dependiente de su nivel de ubiquitinación en función de los tenores de oxígeno (**Figura 58**). La poli-ubiquitinación constituiría una señal de degradación en el proteasoma de 26S, mientras que la mono-ubiquitinación provocaría la exportación de HIF- $\alpha$ /Sima al citoplasma. Es relevante destacar que la mono-ubiquitinación -a diferencia de la poli-ubiquitinación- puede ser reversible gracias a la acción de de-ubiquitininas. Se identificó en mamíferos una ubiquitin-hidrolasa de HIF- $\alpha$  denominada VDU2 (“VHL-interacting deubiquitinating enzyme 2”), cuya actividad estabiliza a la proteína, incrementando en consecuencia la expresión de genes blanco (Li et al., 2005).



**Figura 58.** Regulación de Sima por el oxígeno.

Se muestran los posibles mecanismos que regulan la estabilidad proteica y la localización subcelular de Sima. En normoxia, la proteína podría en parte ser constitutivamente importada al núcleo o ser retenida en el citoplasma por un mecanismo dependiente del sistema prolin hidroxilasa/VHL y la chaperona citosólica Hsp83. Cuando la proteína ingresa al núcleo, en presencia de oxígeno es rápidamente exportada al citoplasma por mecanismos dependientes e independientes del receptor de exportación nuclear CRM1/Embargoed. Para que la exportación de Sima tenga lugar, es necesaria la actividad, dentro del núcleo, del sistema prolin hidroxilasa/VHL. En función de la evidencias en HIF-1 $\alpha$  postulamos que, al igual que otros factores de transcripción (por ejemplo p53), la mono-ubiquitinación es la señal que determina la exportación nuclear de Sima en normoxia, mientras que la poli-ubiquitinación lleva a Sima a la degradación en el proteasoma 26S. Además, postulamos que la hidroxilación del residuo de prolina 850, la ubiquitinación y la degradación de Sima ocurre tanto en el citoplasma como en el núcleo. En cambio, a bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia) Sima se acumula dentro del núcleo y forma un hetero-dímero con la subunidad beta, Tango, para inducir la transcripción de genes blanco.

**10. Relación entre degradación proteica y localización subcelular de HIF- $\alpha$ /Sima.**

Cabe preguntarse por qué HIF- $\alpha$ /Sima es expulsada del núcleo en normoxia si en paralelo la proteína es degradada en forma activa. La regulación de la actividad de la mayoría de los factores de transcripción ocurre típicamente a varios niveles, a través de mecanismos parcialmente redundantes que operan en forma simultánea. En este sentido, la regulación de Sima no parece ser una excepción. La regulación dependiente del oxígeno de su estabilidad proteica y de su exportación nuclear parece ocurrir simultáneamente cooperando en la disminución de los niveles nucleares de Sima, previniendo así la transcripción de genes blanco. En hipoxia, en cambio, tanto la degradación como la exportación nuclear están inhibidas, provocando un aumento en los niveles de Sima en el núcleo, compartimiento donde este factor de transcripción cumple su función regulatoria. De este modo, la regulación de la exportación de HIF- $\alpha$ /Sima operaría como un mecanismo adicional para asegurar un control fino de la expresión génica dependiente de oxígeno.

Es fácil imaginar que una maquinaria celular con doble función que depende de un mismo grupo de moléculas (el sistema hidroxilación/VHL) podría ser relevante en la adaptación a condiciones variables de oxígeno como una forma de proveer respuestas rápidas a cambios drásticos en el medio ambiente a través de varios mecanismos de manera simultánea.

## APÉNDICES

**Apéndice 1.** Localización subcelular de Sima en función de los niveles de oxígeno a lo largo del desarrollo.

**Variación en el Desarrollo.** Utilizamos el análisis estadístico Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para demostrar la variación en la localización subcelular de Sima a lo largo del desarrollo a distintos niveles de oxígeno.

% O <sub>2</sub>	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
21	<10 <sup>-4</sup>	87,3	+
5	<10 <sup>-4</sup>	88,3	+
3	<10 <sup>-4</sup>	124,9	+
1	<10 <sup>-4</sup>	38,7	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Efecto en la disminución de los niveles de oxígeno.** Aplicamos el test estadístico Chi-cuadrado para analizar el efecto del oxígeno sobre la localización subcelular de Sima, en cada uno de los estadios embrionarios analizados:

1) Diferencia entre 21% (normoxia) y 5% (hipoxia) de oxígeno.

Estadios	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
11-12	0,281	2,5	-
13-14	<10 <sup>-3</sup>	13,7	+
15	<10 <sup>-4</sup>	28,7	+
16	<10 <sup>-4</sup>	24,7	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) Diferencia entre 5% y 3% de oxígeno.

Estadio	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
11-12	<10 <sup>-3</sup>	14,2	+
13-14	0,2631	2,7	-
15	0,0529	5,9	-
16	<10 <sup>-4</sup>	87	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.



**Apéndice 2.** Efecto de la mutación de la NES dentro del ODDD sobre la localización subcelular de Sima. Análisis estadístico por Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comparar la localización subcelular de Sima WT con la de Sima<sup>NES</sup> a lo largo del desarrollo a diferentes niveles de oxígeno:

1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha=0,05$ )
Estadios 11-12	0,0246	7,4	+
Estadios 13-14	0,3773	2	-
Estadio 15	0,0196	7,9	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	42	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha=0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	27,2	+
Estadios 13-14	0,8205	0,4	-
Estadio 15	0,0973	4,6	-
Estadio 16	0,0009	14,1	+

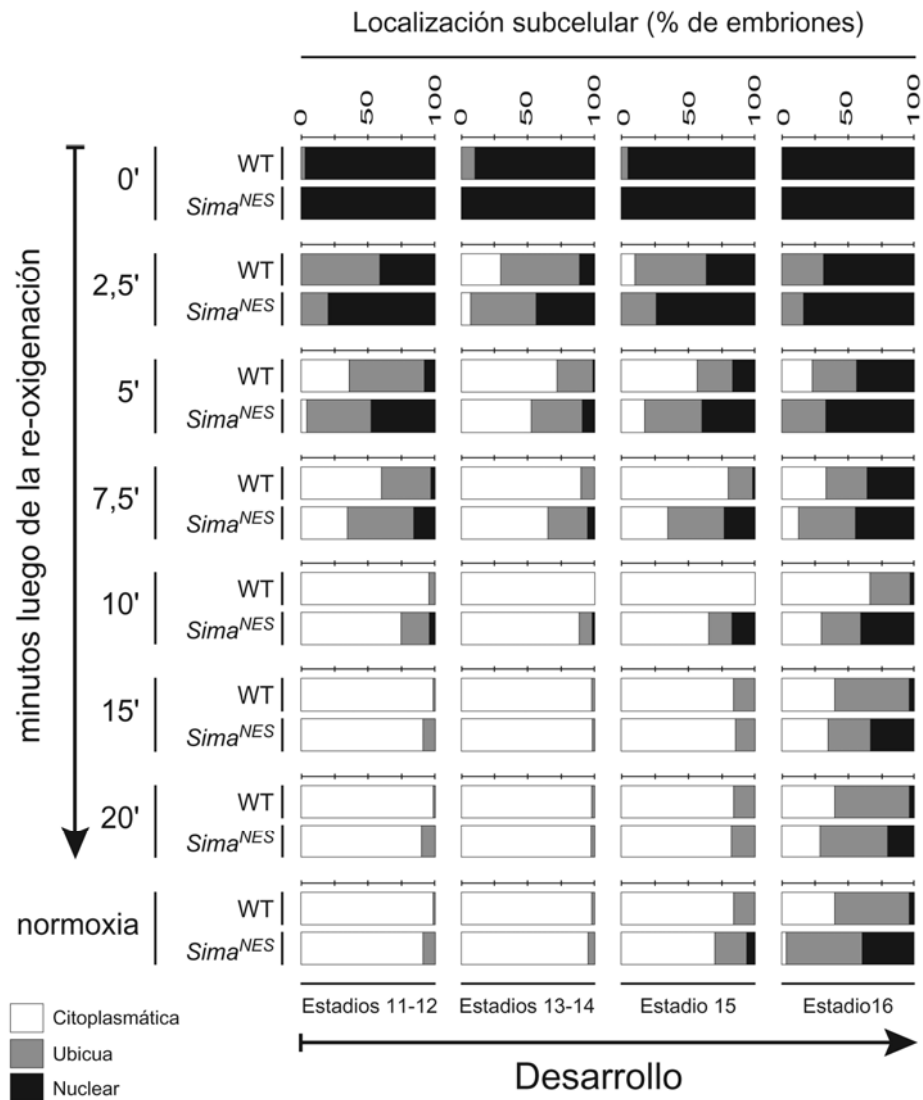
$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha=0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	19,5	+
Estadios 13-14	0,4760	1,6	-
Estadio 15	0,0153	8,4	+
Estadio 16	0,6462	0,9	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 3.** Se compara la localización subcelular de Sima WT con la de Sima mutada en la NES del ODDD (*Sima<sup>NES</sup>*) a diferentes tiempos luego de la re-oxigenación en para distintos estadios del desarrollo. *Sima<sup>NES</sup>* mostró una cinética de exportación más lenta que la de Sima WT.



**Apéndice 4.** Análisis estadísticos de la cinética de exportación de Sima<sup>NES</sup> en experimentos de re-oxigenación.

**Test de Kaplan-Meyer.** La cinética de exportación para Sima<sup>NES</sup> luego de la re-oxigenación fue significativamente diferente a la de Sima WT, en todos los estadios del desarrollo estudiados.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	17,5	+
Estadios 13-14	0.0489	3,9	+
Estadio 15	0,0003	13,2	+
Estadio 16	0,0011	10,6	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 5.** Caracterización del efecto de los alelos mutantes de *embargoed* sobre la localización subcelular de Sima en normoxia.

Análisis estadístico Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para evaluar la variación en la localización subcelular de Sima en normoxia entre embriones WT y mutantes *embargoed*:

1) Alelo *emb<sup>2</sup>*.

% O <sub>2</sub>	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,324	2,3	-
Estadios 13-14	0,6497	0,8	-
Estadio 15	0,9498	0,1	-
Estadio 16	0,5858	1,1	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) Alelo *emb<sup>3</sup>*.

Estadio	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,0682	5,4	-
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	31,3	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	19,7	+
Estadio 16	<10 <sup>-3</sup>	38,7	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

3) Alelo *emb<sup>k16715</sup>*.

Estadio	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	20,1	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	69,4	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	48,2	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	28,1	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 6.** Localización subcelular de Sima en embriones *emb<sup>3</sup>* en hipoxia.

Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para evaluar las diferencias de localización subcelular de Sima entre embriones WT y mutantes homocigotas para *emb<sup>3</sup>* en distintos estadios del desarrollo y niveles de oxígeno:

1) Oxígeno 5%.

Estadio	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,3511	2,4	-
Estadios 13-14	0,002	12,1	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	25	+
Estadio 16	0,0029	11,7	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) Oxígeno 3%.

Estadio	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,6392	0,9	-
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	29	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	39,4	+
Estadio 16	-	-	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 7.** Localización subcelular de Sima en embriones *emb<sup>k16715</sup>* en hipoxia.

Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para evaluar las diferencias de localización subcelular de Sima entre embriones WT y mutantes homocigotas para *emb<sup>k16715</sup>* en distintos estadios del desarrollo y niveles de oxígeno:

1) Oxígeno 5%.

Estadio	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,002	12,2	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	27,7	+
Estadio 15	<10 <sup>-3</sup>	13,9	+
Estadio 16	0,007	9,9	+

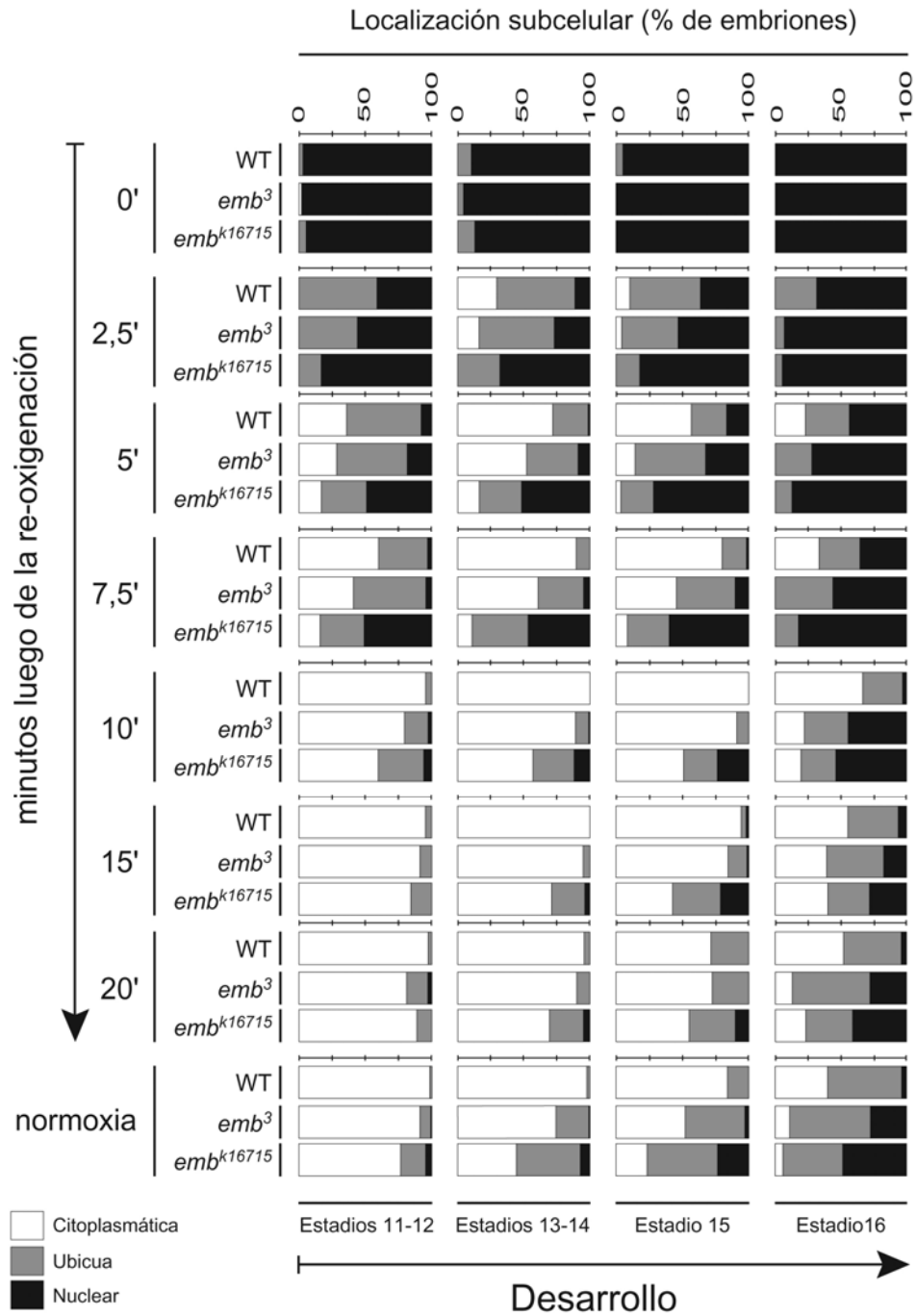
$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) Oxígeno 3%.

Estadio	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha=0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	49,1	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	65,4	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	25,3	+
Estadio 16	-	-	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 8.** Se compara la distribución de la localización subcelular de Sima entre embriones WT y mutantes *embargoed* (alelos *emb<sup>3</sup>* y *emb<sup>k16715</sup>*) a diferentes tiempos luego de la re-oxigenación, en distintos estadios del desarrollo.



**Apéndice 9.** Análisis de la cinética de exportación de Sima en embriones WT y con pérdida de función de *embargoed*.

Test de Kaplan-Meyer para comparar la cinética de exportación de Sima en embriones WT con la de mutantes *embargoed*:

1) Alelo *emb<sup>3</sup>*.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0.0515	3.8	-
Estadios 13-14	0.0325	4.6	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	15.65	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	19.97	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) Alelo *emb<sup>k16715</sup>*.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	28.9	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	29.9	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	38.5	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	29	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.



**Apéndice 10.** Efecto de la sobre-expresión de *embargoed* sobre la localización subcelular de Sima en el equilibrio.

Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comparar la localización subcelular de Sima de embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *embargoed*, a lo largo del desarrollo a diferentes niveles de oxígeno:

1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	>0,8	-	-
Estadios 13-14	>0,8	-	-
Estadio 15	0,022	7,6	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	27,4	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,1750	3,4	-
Estadios 13-14	0,0959	4,7	-
Estadio 15	0,0012	13,5	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	45,1	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,2230	3	-
Estadios 13-14	0,3	2,4	-
Estadio 15	0,0002	16,9	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	60,1	+

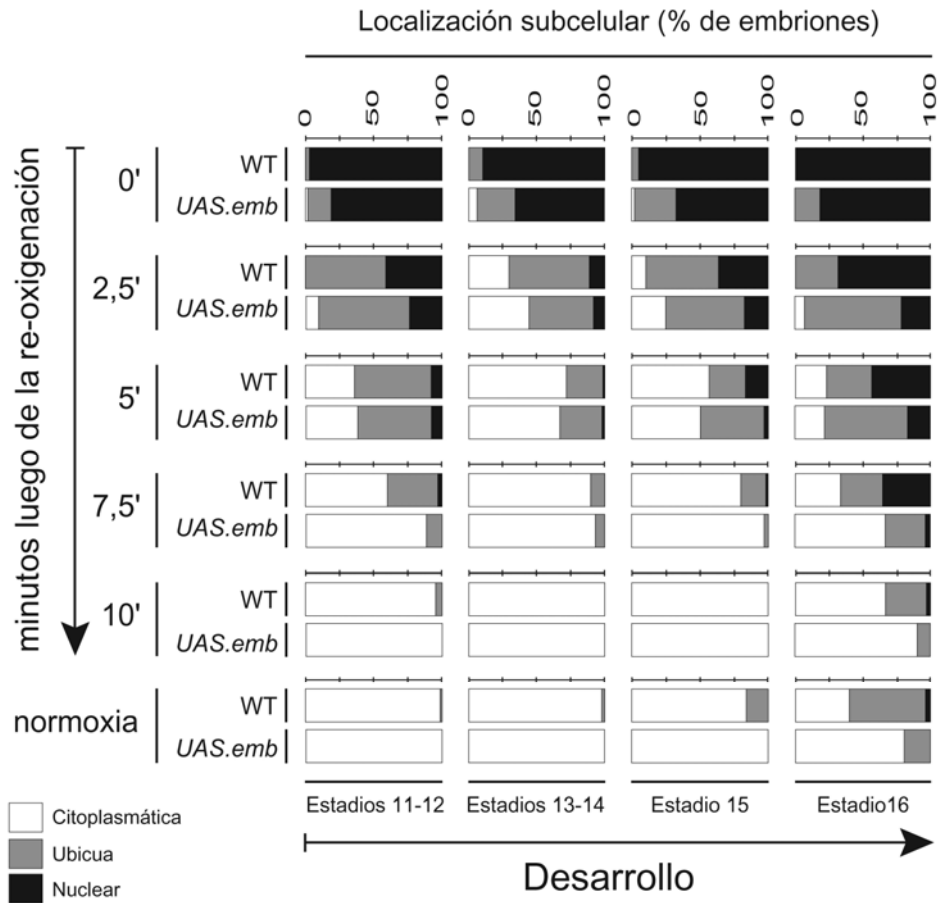
$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

4) 1% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	27,5	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	92,2	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	57,7	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	21	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 11.** Se compara la localización subcelular de Sima en embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *embargoed*, a diferentes tiempos luego de la re-oxigenación, en distintos estadios del desarrollo. Los embriones que sobre-expresan *embargoed* muestra una cinética de exportación de Sima más rápida que los embriones WT.



**Apéndice 12.** Test de Kaplan-Meyer para comparar la cinética de exportación de Sima en embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *embargoed* en experimentos de re-oxigenación, en distintos estadios del desarrollo.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0.0983	2,7	-
Estadios 13-14	0.1024	2,7	-
Estadio 15	0,0144	6	+
Estadio 16	$<10^{-4}$	16,4	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 13.** Efecto de la pérdida de función de *fatiga* sobre la localización subcelular de Sima en el equilibrio.

Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comparar la localización subcelular de Sima de embriones WT con la de mutantes para el gen *fatiga*, a lo largo del desarrollo y a diferentes porcentajes de oxígeno:

1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	84,16	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	101,2	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	102,5	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	86,84	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	84,4	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	114,1	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	78,18	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	87,03	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	131,3	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	137,2	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	87,03	+
Estadio 16	-	-	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 14.** Rescate por sobre-expresión de FatigaB del efecto de la pérdida de función de *fatiga* sobre la localización subcelular de Sima.

La localización subcelular de Sima en embriones mutantes para *fatiga* que sobre-expresan FatigaB se comparó, mediante el test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), con la de embriones WT o embriones mutantes para *fatiga*, a lo largo del desarrollo y a diferentes niveles de oxígeno:

- 1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	Rescate FgaB vs WT			Rescate FgaB vs <i>fatiga</i> <sup>l</sup>		
	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,7092	0,7	-	<10 <sup>-4</sup>	46,3	+
Estadios 13-14	0,3966	1,8	-	<10 <sup>-4</sup>	46,8	+
Estadio 15	0,9019	0,2	-	<10 <sup>-4</sup>	67,8	+
Estadio 16	0,0806	5	-	<10 <sup>-4</sup>	49,4	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

- 2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	Rescate FgaB vs WT			Rescate FgaB vs <i>fatiga</i> <sup>l</sup>		
	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,1701	3,5	-	<10 <sup>-4</sup>	51,5	+
Estadios 13-14	0,1523	3,8	-	<10 <sup>-4</sup>	84,9	+
Estadio 15	0,0650	5,5	-	<10 <sup>-4</sup>	100	+
Estadio 16	0,6264	0,9	-	<10 <sup>-4</sup>	29,2	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

- 3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	Rescate FgaB vs WT			Rescate FgaB vs <i>fatiga</i> <sup>l</sup>		
	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,8217	0,4	-	<10 <sup>-4</sup>	102,6	+
Estadios 13-14	0,4982	1,4	-	<10 <sup>-4</sup>	78	+
Estadio 15	0,0799	5,1	-	<10 <sup>-4</sup>	52,9	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	23	+	<10 <sup>-4</sup>	33,3	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 15.** Efecto de la sobre-expresión de *fatigaB* sobre la localización subcelular de Sima en el equilibrio.

Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comparar la localización subcelular de Sima en embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *fatigaB*, a lo largo del desarrollo a diferentes niveles de oxígeno:

1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,4758	1,5	-
Estadios 13-14	0,3494	2,1	-
Estadio 15	0,6381	0,9	-
Estadio 16	0,1814	3,4	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,6478	0,9	-
Estadios 13-14	0,0031	11,6	+
Estadio 15	0,0861	4,9	-
Estadio 16	0,0578	6,1	-

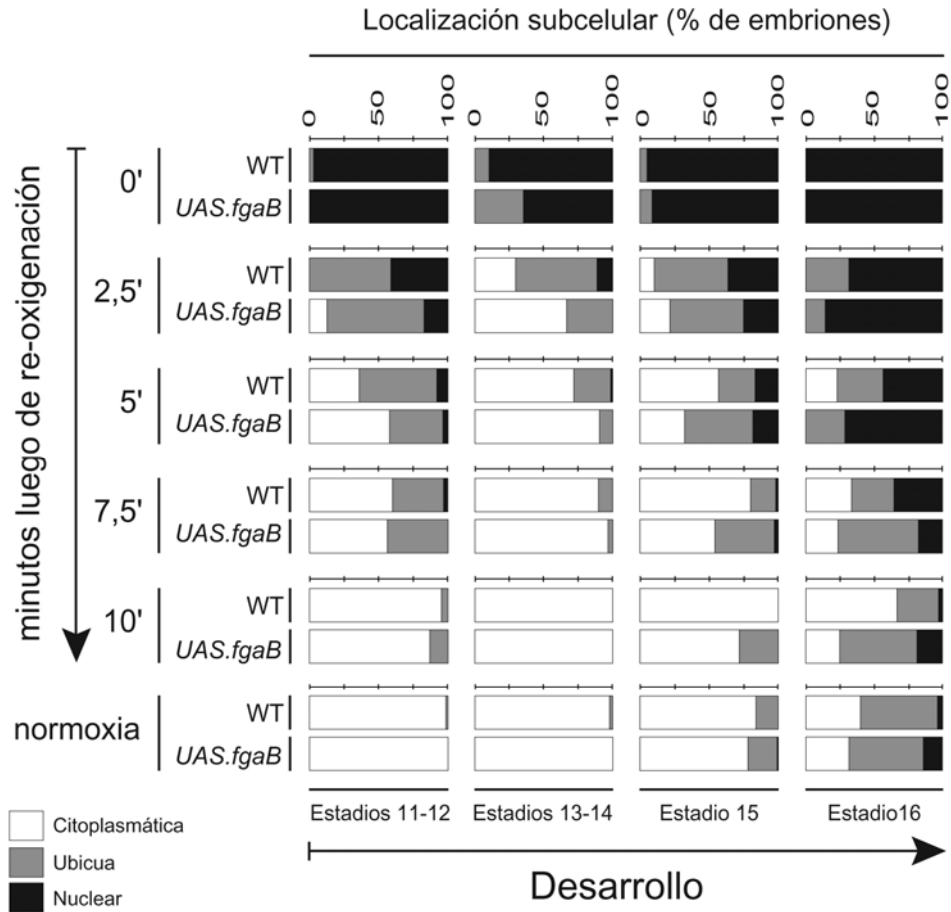
$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,5182	1,3	-
Estadios 13-14	0,6091	1	-
Estadio 15	0,0145	8,5	+
Estadio 16	-	-	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 16.** Se compara la localización subcelular de Sima en embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *fatigaB*, a diferentes tiempos luego de la re-oxigenación, en distintos estadios del desarrollo.



**Apéndice 17.** Test de Kaplan-Meyer para comparar la cinética de exportación de Sima en embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *fatigaB* en experimentos de re-oxigenación, en distintos estadios del desarrollo.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,0302	4,7	+
Estadios 13-14	0,0004	12,6	+
Estadio 15	0,7023	0,1	-
Estadio 16	0,6880	0,2	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.



**Apéndice 18.** Efecto de la pérdida de función de *VHL* sobre la localización subcelular de Sima en el equilibrio.

Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comparar la localización subcelular de Sima en embriones WT con la de embriones mutantes para *VHL*, a lo largo del desarrollo a diferentes niveles de oxígeno:

1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	28,6	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	131,9	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	114,7	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	98,3	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	32,6	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	35,8	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	46,1	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	44,7	+

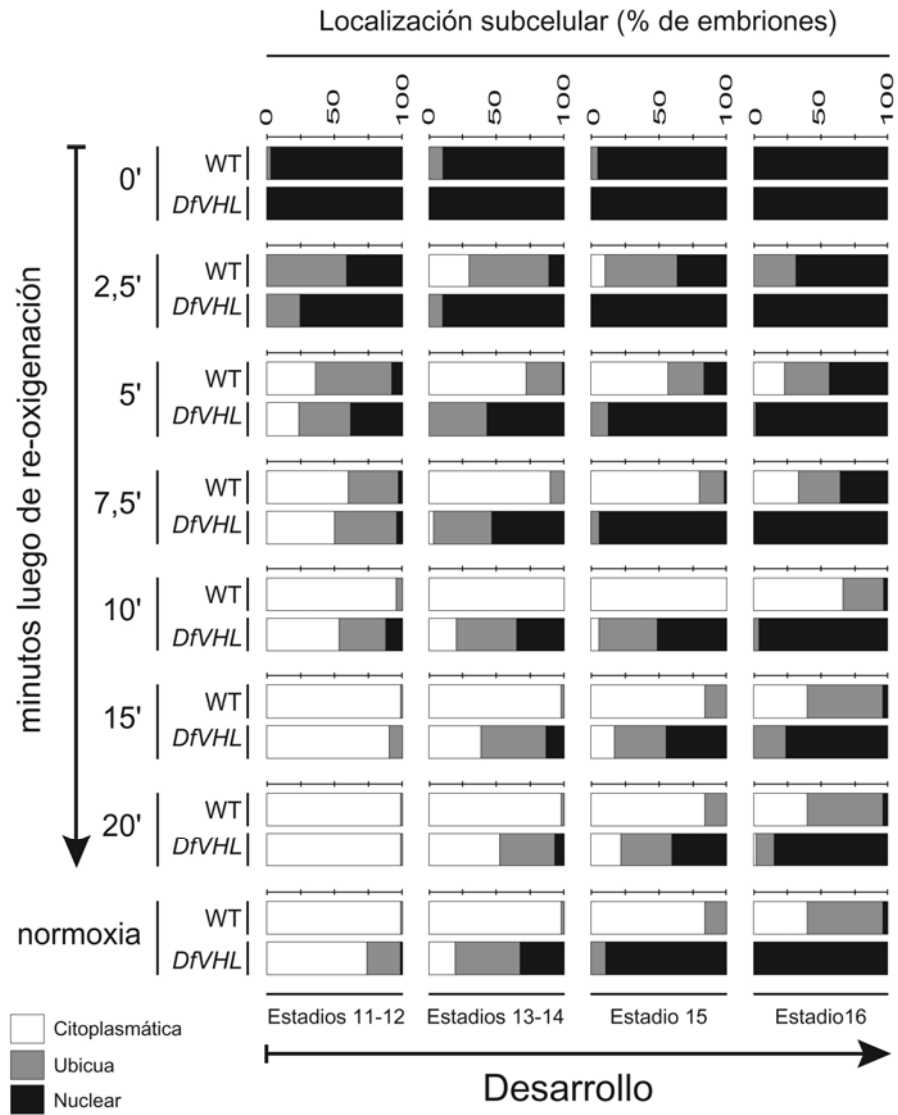
$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	45,5	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	76,1	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	77,3	+
Estadio 16	-	-	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 19.** Se compara la localización subcelular de Sima en embriones WT con la de embriones con pérdida de función de *VHL* a diferentes tiempos luego de la re-oxigenación, en distintos estadios del desarrollo.



**Apéndice 20.** Test de Kaplan-Meyer para comparar la cinética de exportación de Sima en embriones WT con la de embriones con pérdida de función de *VHL* en experimentos de re-oxigenación, en distintos estadios del desarrollo.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,0004	12,6	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	45,2	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	78,1	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	75,1	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 21.** Efecto de la sobre-expresión de *VHL* sobre la localización subcelular de Sima en el equilibrio.

Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comparar la localización subcelular de Sima en embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *VHL*, a lo largo del desarrollo a diferentes niveles de oxígeno:

1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,4069	1,8	-
Estadios 13-14	0,4896	1,4	-
Estadio 15	0,0065	10,1	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	30,2	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,1809	3,4	-
Estadios 13-14	0,0460	6,2	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	22,9	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	23	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,0003	16,4	+
Estadios 13-14	0,8890	0,2	-
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	23,8	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	29,5	+

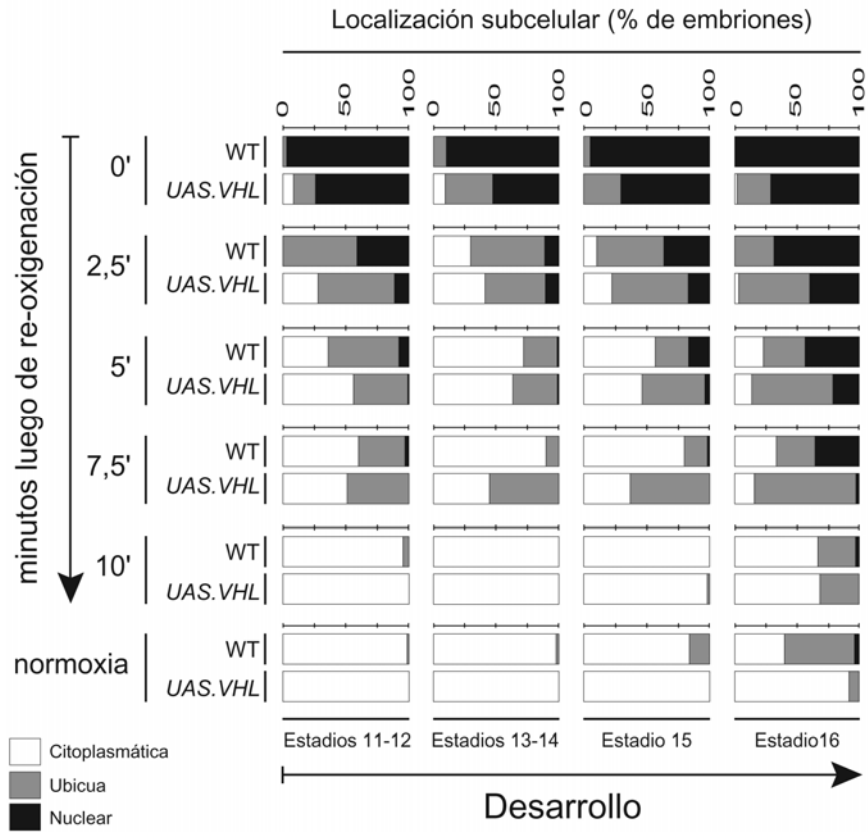
$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

4) 1% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	21,8	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	33,2	+
Estadio 15	0,0013	13,3	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	18,7	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 22.** Se compara la localización subcelular de Sima en embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *VHL*, a diferentes tiempos luego de la re-oxigenación, en distintos estadios del desarrollo.



**Apéndice 23.** Test de Kaplan-Meyer para comparar la cinética de exportación de Sima en embriones WT con la de embriones con que sobre-expresan *VHL* en experimentos de re-oxigenación, en distintos estadios del desarrollo.

% O <sub>2</sub>	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,0009	11,1	+
Estadios 13-14	0,1024	2,7	-
Estadio 15	0,0092	6,8	+
Estadio 16	0,0008	11,3	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 24.** Efecto de la sobre-expresión de *embargoed* sobre la localización subcelular de la proteína SimaP850A en O<sub>2</sub> 3%.

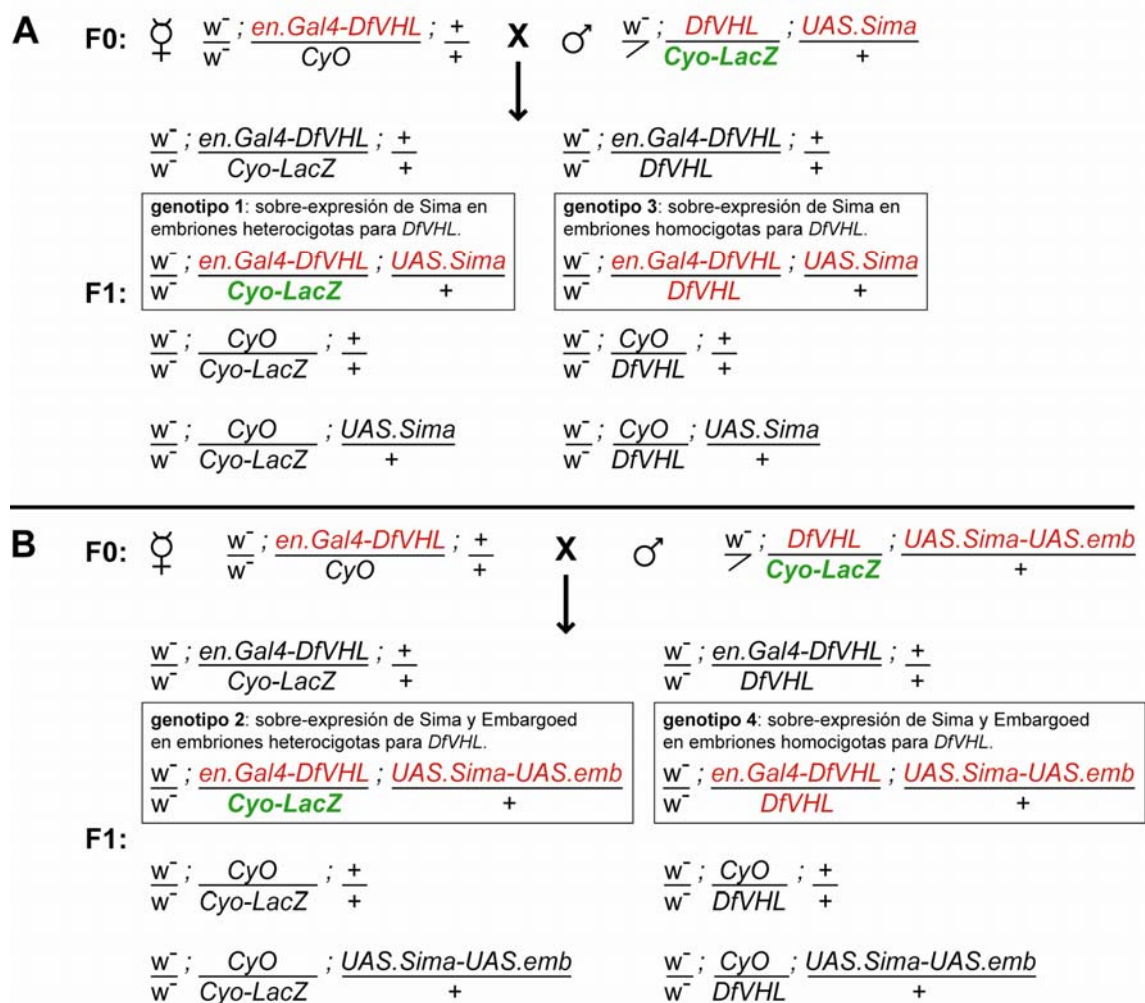
Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para evaluar las diferencias en la localización subcelular de Sima WT con la de Sima mutada en la 850 tras la sobre-expresión de *embargoed* en los estadios 15 y 16 en O<sub>2</sub> 3%.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadio 15	$<10^{-4}$	66,3	+
Estadio 16	$<10^{-4}$	60,1	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 25.** Esquema de cruzamientos para analizar si VHL es necesario para la exportación nuclear de Sima mediada por Embargoed.

Realizamos dos tipos de cruzamientos (**A** y **B**) para obtener los cuatro genotipos necesarios para evaluar el experimento, los cuales pueden ser claramente identificados mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra Sima y contra la proteína LacZ. (**A**) A partir de este cruzamiento obtuvimos los genotipos: *en.Gal4/UAS.Sima* (**1**) y *en.Gal4/UAS.Sima; DfVHL* (**3**) en función de la presencia o ausencia del marcador LacZ. Los embriones positivos para LacZ corresponden al genotipo **1**, dado que sobre-expresan Sima en embriones heterocigotas para *DfVHL*. En cambio, embriones negativos para LacZ, que corresponden al genotipo **3**, sobre-expresan Sima y son homocigotas para *DfVHL*. (**B**) Este segundo cruzamiento generó los genotipos *en.Gal4/UAS.Sima; UAS.embargoed* (**2**) y *en.Gal4/UAS.Sima; UAS.embargoed; DfVHL* (**4**), la diferencia con el primer cruzamiento radica en que además de sobre-expresar Sima también lo hacen para Embargoed. De esta manera, embriones positivos para LacZ presentan el genotipo **2**, mientras que embriones negativos para este marcador corresponden al genotipo **4**.





**Apéndice 26.** La exportación nuclear de Sima mediada por Embargoed necesita de la actividad de la proteína VHL.

Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comparar la localización subcelular de Sima en embriones que sobre-expresan *embargoed* y además presentan pérdida de función de *VHL* con: **I)** Embriones WT, **II)** Embriones que sobre-expresan *embargoed* y **III)** Embriones con pérdida de función de *VHL*; a lo largo del desarrollo y a diferentes niveles de oxígeno:

1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs WT			<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs <i>UAS.emb</i>			<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs <i>Df(VHL)</i>		
	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )
Est. 11-12	<10 <sup>-4</sup>	20,2	+	0,007	9,9	+	0,673	0,8	-
Est. 13-14	<10 <sup>-4</sup>	110,9	+	<10 <sup>-4</sup>	70,9	+	0,156	3,7	-
Est. 15	<10 <sup>-4</sup>	96,2	+	<10 <sup>-4</sup>	100	+	<10 <sup>-3</sup>	17,8	+
Est. 16	<10 <sup>-4</sup>	41,3	+	<10 <sup>-4</sup>	102	+	<10 <sup>-4</sup>	26,9	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs WT			<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs <i>UAS.emb</i>			<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs <i>Df(VHL)</i>		
	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )
Est. 11-12	<10 <sup>-4</sup>	32,2	+	<10 <sup>-4</sup>	27,8	+	0,816	0,4	-
Est. 13-14	<10 <sup>-4</sup>	24,8	+	<10 <sup>-4</sup>	32,1	+	0,896	0,2	-
Est. 15	<10 <sup>-4</sup>	33,3	+	<10 <sup>-4</sup>	55,3	+	0,092	4,8	-
Est. 16	<10 <sup>-4</sup>	31,2	+	<10 <sup>-4</sup>	82,8	+	0,084	5	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs WT			<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs <i>UAS.emb</i>			<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs <i>Df(VHL)</i>		
	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )
Est. 11-12	<10 <sup>-4</sup>	41,3	+	<10 <sup>-4</sup>	24,9	+	0,9542	0,1	-
Est. 13-14	<10 <sup>-4</sup>	51,9	+	<10 <sup>-4</sup>	19,2	+	0,002	12	+
Est. 15	<10 <sup>-4</sup>	67,2	+	<10 <sup>-4</sup>	62,4	+	-	-	-
Est. 16	<10 <sup>-4</sup>	-	-	<10 <sup>-4</sup>	51,5	+	-	-	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

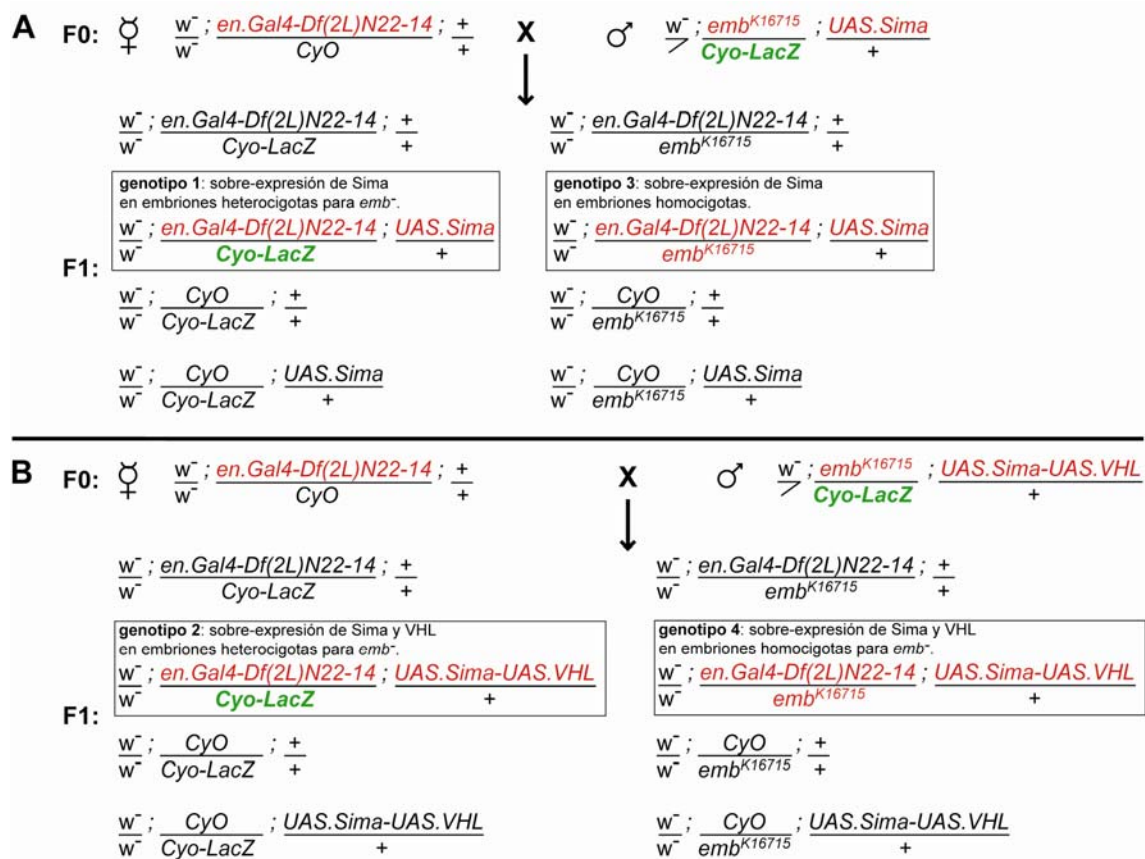
4) 1% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs WT			<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs <i>UAS.emb</i>			<i>UAS.emb/Df(VHL)</i> vs <i>Df(VHL)</i>		
	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha=0,05$ )
Est. 11-12	0,3125	2,3	-	<10 <sup>-3</sup>	15,6	+	-	-	-
Est. 13-14	0,9063	0,2	-	<10 <sup>-4</sup>	59,3	+	-	-	-
Est. 15	0,9981	0,1	-	<10 <sup>-4</sup>	55,7	+	-	-	-
Est. 16	-	-	-	<10 <sup>-4</sup>	25,2	+	-	-	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 27.** Esquema de cruzamientos para analizar si Embargoed es necesario para la exportación nuclear de Sima mediada por VHL.

Embriones mutantes para *embargoed* (trans-heterocigotas para la delección cromosómica *Df(2L)N22-14* que incluye dicho gen y el alelo mutante *emb<sup>K16715</sup>*) que sobre-expresan Sima (**A**) o que sobre-expresan además VHL (**B**). Los embriones portadores del alelo *emb<sup>K16715</sup>* fueron identificados por la ausencia del cromosoma balanceador *Cyo-LacZ*, el cual expresa a la proteína LacZ (detectada en embriones por inmunofluorescencia anti-β-Gal).



**Apéndice 28.** VHL promueve la exportación de Sima también a través de un mecanismo independiente de *embargoed*.

Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comparar la localización subcelular de Sima en embriones que sobre-expresan *VHL* y son además mutantes para *embargoed* con embriones mutantes para *embargoed* solamente; a lo largo del desarrollo a diferentes niveles de oxígeno:

- 1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	UAS.VHL/ <i>emb</i> vs <i>emb</i>		
	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,0141	8,5	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	24,3	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	31,5	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	25,6	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

- 2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	UAS.VHL/ <i>emb</i> vs <i>emb</i>		
	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,5657	1,1	-
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	18,8	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	37,9	+
Estadio 16	0,0003	16,3	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

- 3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	UAS.VHL/ <i>emb</i> vs <i>emb</i>		
	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,0296	7	+
Estadios 13-14	0,0770	5,1	-
Estadio 15	0,06	5,6	-
Estadio 16	0,0092	9,4	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 29.** Efecto de la sobre-expresión de *VHL* en embriones con pérdida de función de *embargoed* sobre la cinética de exportación de Sima en ensayos de re-oxigenación.

Test de Kaplan-Meyer para comparar la cinética de exportación de Sima en embriones que sobre-expresan *VHL* y son mutantes para *embargoed* (trans-heterocigotas para *Df(2L)N22-14* y *emb<sup>K16715</sup>*) en comparación con embriones mutantes para *embargoed*.

% O <sub>2</sub>	<i>UAS.VHL/emb</i> vs <i>emb</i>		
	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha=0,05$ )
Estadios 11-12	0,0410	3,8	+
Estadios 13-14	0,0059	7,6	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	16,3	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	18,8	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 30.** Rescate por sobre-expresión de FatigaA del efecto de la pérdida de función de *fatiga* sobre la localización subcelular de Sima.

La localización subcelular de Sima en embriones que sobre-expresan FatigaA (**FgaA**) en mutantes para el gen *fatiga* se comparó, mediante el test de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), con la localización de Sima en embriones WT o en embriones mutantes para *fatiga*, a lo largo del desarrollo a diferentes niveles de oxígeno:

- 1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	Rescate FgaA vs WT			Rescate FgaA vs <i>fatiga</i> <sup>l</sup>		
	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,6620	0,8	-	<10 <sup>-4</sup>	22	+
Estadios 13-14	0,2419	2,8	-	<10 <sup>-4</sup>	25	+
Estadio 15	0,0311	6,9	+	<10 <sup>-4</sup>	46	+
Estadio 16	0,0103	9,2	+	<10 <sup>-4</sup>	34,3	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

- 2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	Rescate FgaA vs WT			Rescate FgaA vs <i>fatiga</i> <sup>l</sup>		
	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	29	+	<10 <sup>-4</sup>	26	+
Estadios 13-14	0,11	4,4	-	<10 <sup>-4</sup>	94	+
Estadio 15	0,2248	3	-	<10 <sup>-4</sup>	97,6	+
Estadio 16	0,7248	0,6	-	<10 <sup>-4</sup>	35,6	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

- 3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	Rescate FgaA vs WT			Rescate FgaA vs <i>fatiga</i> <sup>l</sup>		
	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	26,5	+	<10 <sup>-4</sup>	57	+
Estadios 13-14	0,1076	4,5	-	<10 <sup>-4</sup>	66,2	+
Estadio 15	0,8287	0,4	-	<10 <sup>-4</sup>	62,5	+
Estadio 16	<10 <sup>-3</sup>	18,1	+	<10 <sup>-4</sup>	26,7	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 31.** Efecto de la sobre-expresión de *fatigaA* sobre la localización subcelular de Sima en el equilibrio.

Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comparar la localización subcelular de Sima en embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *fatigaA*, a lo largo del desarrollo a diferentes niveles de oxígeno:

1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,5361	1,2	-
Estadios 13-14	0,0111	9	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	21	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	34	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,2643	2,7	-
Estadios 13-14	0,2771	2,6	-
Estadio 15	0,0067	10	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	24	+

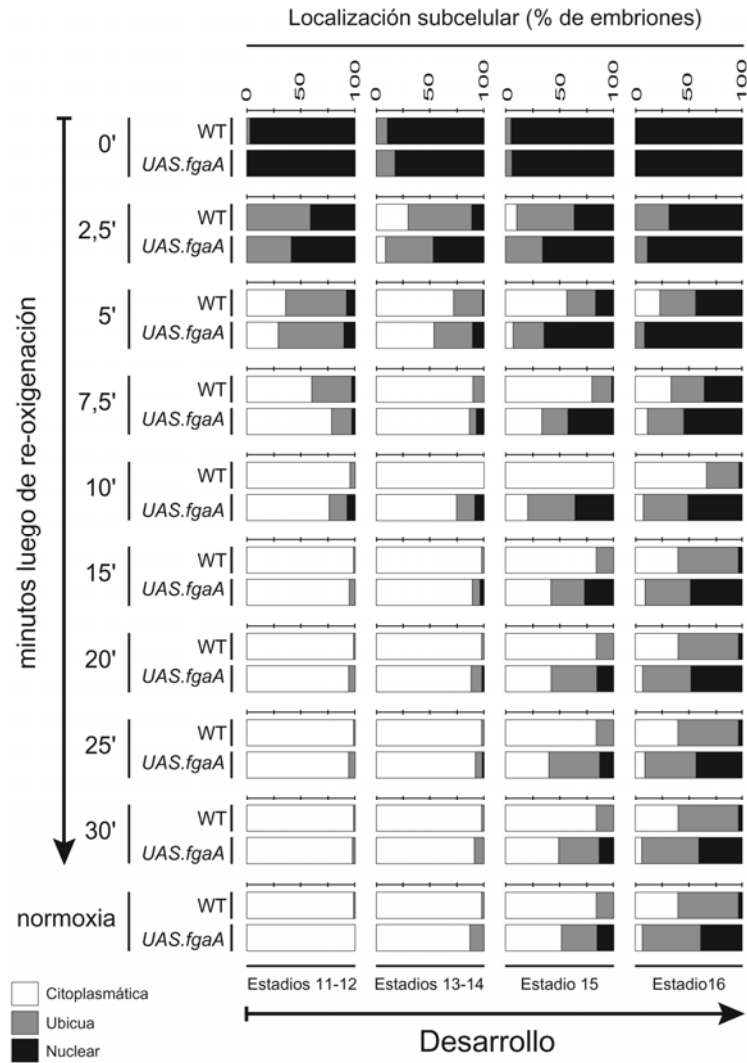
$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	25,8	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	22,9	+
Estadio 15	0,0003	16,2	+
Estadio 16	-	-	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 32.** Se compara la localización subcelular de Sima en embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *fatiga-1*, a diferentes tiempos luego de la re-oxigenación, en distintos estadios del desarrollo.





**Apéndice 33.** Test de Kaplan-Meyer para comparar la cinética de exportación de Sima en embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *fatigaA* en experimentos de re-oxigenación, en distintos estadios del desarrollo.

% O <sub>2</sub>	P	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,2100	1,6	-
Estadios 13-14	0,0264	4,9	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	25,2	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	22,6	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

**Apéndice 34.** Efecto de la sobre-expresión de *svSima* sobre la localización subcelular de *Sima* en el equilibrio.

Análisis de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para comparar la localización subcelular de flSima en embriones WT con la de embriones que sobre-expresan *svSima*, a lo largo del desarrollo a diferentes niveles de oxígeno:

1) 21% de O<sub>2</sub> (normoxia).

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,5102	1,4	-
Estadios 13-14	0,4134	1,8	-
Estadio 15	0,9904	0,1	-
Estadio 16	0,9811	0,1	-

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

2) 5% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,6855	0,8	-
Estadios 13-14	0,0002	17,2	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	48,2	+
Estadio 16	0,0011	13,6	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

3) 3% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	0,0009	14	+
Estadios 13-14	0,0163	8	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	26,6	+
Estadio 16	<10 <sup>-4</sup>	27,7	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

4) 1% de O<sub>2</sub>.

% O <sub>2</sub>	p	$\chi^2$ ; df=6	Significancia Estadística ( $\alpha= 0,05$ )
Estadios 11-12	<10 <sup>-4</sup>	59,5	+
Estadios 13-14	<10 <sup>-4</sup>	131,3	+
Estadio 15	<10 <sup>-4</sup>	53,9	+
Estadio 16	0,0044	10,8	+

$\chi^2$ , valores de Chi-cuadrado. P, valor del P. df, grados de libertad.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abu-Shumays, R.L. and Fristrom, J.W. (1997) IMP-L3, A 20-hydroxyecdysone-responsive gene encodes *Drosophila* lactate dehydrogenase: structural characterization and developmental studies. *Dev Genet*, **20**, 11-22.
- Adryan, B., Decker, H.J., Papas, T.S. and Hsu, T. (2000) Tracheal development and the von Hippel-Lindau tumor suppressor homolog in *Drosophila*. *Oncogene*, **19**, 2803-2811.
- Ansieau, S. and Leutz, A. (2002) The conserved Mynd domain of BS69 binds cellular and oncoviral proteins through a common PXLXP motif. *J Biol Chem*, **277**, 4906-4910.
- Appelhoff, R.J., Tian, Y.M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Gleadle, J.M. (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, **279**, 38458-38465.
- Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M.A., Bunn, H.F. and Livingston, D.M. (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12969-12973.
- Bacon, N.C., Wappner, P., JF, O.R., Bartlett, S.M., Shilo, B., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (1998) Regulation of the *Drosophila* bHLH-PAS protein Sima by hypoxia: functional evidence for homology with mammalian HIF-1 alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, **249**, 811-816.
- Bae, S.H., Jeong, J.W., Park, J.A., Kim, S.H., Bae, M.K., Choi, S.J. and Kim, K.W. (2004) Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **324**, 394-400.
- Beck, I., Ramirez, S., Weinmann, R. and Caro, J. (1991) Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J Biol Chem*, **266**, 15563-15566.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D. and Pouyssegur, J. (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo J*, **22**, 4082-4090.
- Berra, E., Ginouves, A. and Pouyssegur, J. (2006) The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep*, **7**, 41-45.
- Berra, E., Richard, D.E., Gothie, E. and Pouyssegur, J. (2001a) HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation. *Febs Lett*, **491**, 85-90.
- Berra, E., Roux, D., Richard, D.E. and Pouyssegur, J. (2001b) Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) escapes O(2)-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep*, **2**, 615-620.
- Blanchard, K.L., Acquaviva, A.M., Galson, D.L. and Bunn, H.F. (1992) Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol Cell Biol*, **12**, 5373-5385.
- Bondurant, M.C. and Koury, M.J. (1986) Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol*, **6**, 2731-2733.
- Bonicalzi, M.E., Groulx, I., de Paulsen, N. and Lee, S. (2001) Role of exon 2-encoded beta -domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, **276**, 1407-1416.
- Boyd, S.D., Tsai, K.Y. and Jacks, T. (2000) An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat Cell Biol*, **2**, 563-568.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401-415.
- Bruick, R.K. and McKnight, S.L. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, **294**, 1337-1340.
- Bunn, H.F. and Poyton, R.O. (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*, **76**, 839-885.
- Caro, J., Beck, I., Ramirez, S., Costa-Giomi, P. and Schuster, S.J. (1991) Regulation of erythropoietin gene expression. *Semin Hematol*, **28**, 42-45; discussion 45-46.
- Carver, L.A., Jackiw, V. and Bradfield, C.A. (1994) The 90-kDa heat shock protein is essential for Ah receptor signaling in a yeast expression system. *J Biol Chem*, **269**, 30109-30112.
- Centanin, L., Ratcliffe, P.J. and Wappner, P. (2005) Reversion of lethality and growth defects in Fatiga oxygen-sensor mutant flies by loss of hypoxia-inducible factor-alpha/Sima. *EMBO Rep*, **6**, 1070-1075.

- Chan, D.A., Sutphin, P.D., Yen, S.E. and Giaccia, A.J. (2005) Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol*, **25**, 6415-6426.
- Chilov, D., Camenisch, G., Kvietikova, I., Ziegler, U., Gassmann, M. and Wenger, R.H. (1999) Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1alpha. *J Cell Sci*, **112 ( Pt 8)**, 1203-1212.
- Choi, K.O., Lee, T., Lee, N., Kim, J.H., Yang, E.G., Yoon, J.M., Lee, T.G. and Park, H. (2005) Inhibition of the catalytic activity of hypoxia-inducible factor-1alpha-prolyl-hydroxylase 2 by a MYND-type zinc finger. *Mol Pharmacol*, **68**, 1803-1809.
- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A.L. and Hershko, A. (1980) ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1365-1368.
- Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R. and Hershko, A. (1981) Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 761-765.
- Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Maxwell, P.H. (2000) Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, **275**, 25733-25741.
- Collier, S., Chan, H.Y., Toda, T., McKimmie, C., Johnson, G., Adler, P.N., O'Kane, C. and Ashburner, M. (2000) The *Drosophila* embargoed gene is required for larval progression and encodes the functional homolog of *Schizosaccharomyces* Crm1. *Genetics*, **155**, 1799-1807.
- Coumailleau, P., Poellinger, L., Gustafsson, J.A. and Whitelaw, M.L. (1995) Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity. *J Biol Chem*, **270**, 25291-25300.
- Dekanty, A., Lavista-Llanos, S., Irisarri, M., Oldham, S. and Wappner, P. (2005) The insulin-PI3K/TOR pathway induces a HIF-dependent transcriptional response in *Drosophila* by promoting nuclear localization of HIF-alpha/Sima. *J Cell Sci*, **118**, 5431-5441.
- Dingwall, C. and Laskey, R.A. (1991) Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci*, **16**, 478-481.
- Elson, D.A., Thurston, G., Huang, L.E., Ginzinger, D.G., McDonald, D.M., Johnson, R.S. and Arbeit, J.M. (2001) Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev*, **15**, 2520-2532.
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L. and Fujii-Kuriyama, Y. (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J*, **18**, 1905-1914.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4273-4278.
- 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., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J. and Ratcliffe, P.J. (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, **107**, 43-54.
- Erslev, A. (1953) Humoral regulation of red cell production. *Blood*, **8**, 349-357.
- Fabbro, M. and Henderson, B.R. (2003) Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res*, **282**, 59-69.
- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G. and Semenza, G.L. (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*, **59**, 3915-3918.

- Fernandez, R., Tabarini, D., Azpiazu, N., Frasch, M. and Schlessinger, J. (1995) The Drosophila insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential. *Embo J*, **14**, 3373-3384.
- Flamme, I., Frohlich, T., von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A. and Risau, W. (1997) HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev*, **63**, 51-60.
- Fornierod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I.W. (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, **90**, 1051-1060.
- Frei, C. and Edgar, B.A. (2004) Drosophila cyclin D/Cdk4 requires Hif-1 prolyl hydroxylase to drive cell growth. *Dev Cell*, **6**, 241-251.
- Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y.D., Ellis, L.M. and Semenza, G.L. (2002) Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*, **277**, 38205-38211.
- Fukunaga, B.N., Probst, M.R., Reisz-Porszasz, S. and Hankinson, O. (1995) Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, **270**, 29270-29278.
- Garofalo, R.S. and Rosen, O.M. (1988) Tissue localization of Drosophila melanogaster insulin receptor transcripts during development. *Mol Cell Biol*, **8**, 1638-1647.
- Geyer, R.K., Yu, Z.K. and Maki, C.G. (2000) The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat Cell Biol*, **2**, 569-573.
- Gleadle, J.M. and Ratcliffe, P.J. (1998) Hypoxia and the regulation of gene expression. *Mol Med Today*, **4**, 122-129.
- Glickman, M.H. and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**, 373-428.
- Gnarra, J.R., Zhou, S., Merrill, M.J., Wagner, J.R., Krumm, A., Papavassiliou, E., Oldfield, E.H., Klausner, R.D. and Linehan, W.M. (1996) Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10589-10594.
- Goldberg, M.A., Dunning, S.P. and Bunn, H.F. (1988) Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, **242**, 1412-1415.
- Goldberg, M.A., Gaut, C.C. and Bunn, H.F. (1991) Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranscriptional events. *Blood*, **77**, 271-277.
- Goldberg, M.A., Imagawa, S., Dunning, P.S. and Bunn, H.F. (1989) Oxygen sensing and erythropoietin gene regulation. *Contrib Nephrol*, **76**, 39-54; discussion 54-36.
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D. and Boyse, E.A. (1975) Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 11-15.
- Gorr, T.A., Tomita, T., Wappner, P. and Bunn, H.F. (2004) Regulation of Drosophila hypoxia-inducible factor (HIF) activity in SL2 cells: identification of a hypoxia-induced variant isoform of the HIFalpha homolog gene similar. *J Biol Chem*, **279**, 36048-36058.
- Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R.H., Kvietikova, I., Hitelaw, M.L., Toftgard, R., Tora, L., Gassmann, M. and Poellinger, L. (1996) Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol*, **16**, 5221-5231.
- Groulx, I. and Lee, S. (2002) Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol*, **22**, 5319-5336.
- Gu, J., Nie, L., Wiederschain, D. and Yuan, Z.M. (2001) Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export. *Mol Cell Biol*, **21**, 8533-8546.
- Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L. and Bradfield, C.A. (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr*, **7**, 205-213.
- Hankinson, O. (1995) The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **35**, 307-340.

- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. and Rose, I.A. (1980) Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1783-1786.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. and Ciechanover, A. (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, **258**, 8206-8214.
- Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Riordan, M.V., Tian, Y.M., Bullock, A.N., Welford, R.W., Elkins, J.M., Oldham, N.J., Bhattacharya, S., Gleadle, J.M., Ratcliffe, P.J., Pugh, C.W. and Schofield, C.J. (2002) Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem*, **277**, 26351-26355.
- Hicks, G.R. and Raikhel, N.V. (1995) Protein import into the nucleus: an integrated view. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 155-188.
- Hochachka, P.W., Buck, L.T., Doll, C.J. and Land, S.C. (1996) Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9493-9498.
- Hofer, T., Desbaillets, I., Hopfl, G., Gassmann, M. and Wenger, R.H. (2001) Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1 $\alpha$  activation cascade: implications for HIF-1 $\alpha$  gene therapy. *Faseb J*, **15**, 2715-2717.
- Hogenesch, J.B., Chan, W.K., Jackiw, V.H., Brown, R.C., Gu, Y.Z., Pray-Grant, M., Perdew, G.H. and Bradfield, C.A. (1997) Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem*, **272**, 8581-8593.
- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S.M. and Lee, F.S. (2002) Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem*, **277**, 39792-39800.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M. and Bunn, H.F. (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its  $\alpha$  subunit. *J Biol Chem*, **271**, 32253-32259.
- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M. and 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7987-7992.
- Huang, Z.J., Ederly, I. and Rosbash, M. (1993) PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature*, **364**, 259-262.
- Hur, E., Chang, K.Y., Lee, E., Lee, S.K. and Park, H. (2001) Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Mol Pharmacol*, **59**, 1216-1224.
- Iliopoulos, O., Levy, A.P., Jiang, C., Kaelin, W.G., Jr. and Goldberg, M.A. (1996) Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10595-10599.
- Imagawa, S., Goldberg, M.A., Doweiko, J. and Bunn, H.F. (1991) Regulatory elements of the erythropoietin gene. *Blood*, **77**, 278-285.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. and Kaelin, W.S. (2001) HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for oxygen sensing. *Science*, **292**, 464-468.
- Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Klausner, R.D. and Pause, A. (1999) Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12436-12441.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (2001) Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468-472.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Sehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fritsch, E.F. and et al. (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, **313**, 806-810.

- Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Fried, W. and Plzak, L. (1957) Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*, **179**, 633-634.
- Jans, D.A. and Hubner, S. (1996) Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev*, **76**, 651-685.
- Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R.H. and Gassmann, M. (2001) Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *Faseb J*, **15**, 1312-1314.
- Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R. and Semenza, G.L. (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **271**, 17771-17778.
- Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R. and Semenza, G.L. (1997) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*, **272**, 19253-19260.
- Kaelin, W.G., Jr. and Maher, E.R. (1998) The VHL tumour-suppressor gene paradigm. *Trends Genet*, **14**, 423-426.
- Kallio, P.J., Okamoto, K., S, O.B., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H. and Poellinger, L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Embo J*, **17**, 6573-6586.
- Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y. and Poellinger, L. (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, **274**, 6519-6525.
- Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N., Skowyra, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Jr., Elledge, S.J., Conaway, R.C., Harper, J.W. and Conaway, J.W. (1999) Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science*, **284**, 657-661.
- Katschinski, D.M., Le, L., Heinrich, D., Wagner, K.F., Hofer, T., Schindler, S.G. and Wenger, R.H. (2002) Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1alpha is dependent on heat shock protein-90 activity. *J Biol Chem*, **277**, 9262-9267.
- Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L. and Pongratz, I. (2001) The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol*, **21**, 2594-2607.
- Kewley, R.J., Whitelaw, M.L. and Chapman-Smith, A. (2004) The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 189-204.
- Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J.A. and Kaelin, W.G., Jr. (1995) Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science*, **269**, 1444-1446.
- Kietzmann, T., Samoylenko, A., Roth, U. and Jungermann, K. (2003) Hypoxia-inducible factor-1 and hypoxia response elements mediate the induction of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by insulin in primary rat hepatocytes. *Blood*, **101**, 907-914.
- Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M. and Esumi, H. (2001) Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem*, **276**, 2292-2298.
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S. and Yoshida, M. (1998) Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res*, **242**, 540-547.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L. and Bruick, R.K. (2002a) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*, **16**, 1466-1471.
- Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J. and Whitelaw, M.L. (2002b) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, **295**, 858-861.
- Lavista-Llanos, S., Centanin, L., Irisarri, M., Russo, D.M., Gleadle, J.M., Bocca, S.N., Muzzopappa, M., Ratcliffe, P.J. and Wappner, P. (2002) Control of the hypoxic response in *Drosophila melanogaster* by the basic helix-loop-helix PAS protein similar. *Mol Cell Biol*, **22**, 6842-6853.
- Lee, J.W., Bae, S.H., Jeong, J.W., Kim, S.H. and Kim, K.W. (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*, **36**, 1-12.
- LeRoith, D., Lesniak, M.A. and Roth, J. (1981) Insulin in insects and annelids. *Diabetes*, **30**, 70-76.



- Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R. and Gu, W. (2003) Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*, **302**, 1972-1975.
- Li, Z., Wang, D., Messing, E.M. and Wu, G. (2005) VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1 $\alpha$ . *EMBO Rep*, **6**, 373-378.
- Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z. and et al. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 7580-7584.
- Lindebro, M.C., Poellinger, L. and Whitelaw, M.L. (1995) Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. *Embo J*, **14**, 3528-3539.
- Lisztwan, J., Imbert, G., Wirbelauer, C., Gstaiger, M. and Krek, W. (1999) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev*, **13**, 1822-1833.
- Luo, J.C. and Shibuya, M. (2001) A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  and 3 $\alpha$ ). *Oncogene*, **20**, 1435-1444.
- Mahon, P.C., Hirota, K. and 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 Dev*, **15**, 2675-2686.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A. and Poellinger, L. (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, **414**, 550-554.
- Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.J., Tanaka, H. and Poellinger, L. (2002) Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 $\alpha$  locus. *J Biol Chem*, **277**, 32405-32408.
- Marxsen, J.H., Stengel, P., Doege, K., Heikkinen, P., Jokilehto, T., Wagner, T., Jelkmann, W., Jaakkola, P. and Metzen, E. (2004) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- $\alpha$ -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J*, **381**, 761-767.
- Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J*, **20**, 5197-5206.
- Maxwell, P.H., Osmond, M.K., Pugh, C.W., Heryet, A., Nicholls, L.G., Tan, C.C., Doe, B.G., Ferguson, D.J., Johnson, M.H. and Ratcliffe, P.J. (1993a) Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int*, **44**, 1149-1162.
- Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (1993b) Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2423-2427.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. and Ratcliffe, P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis [see comments]. *Nature*, **399**, 271-275.
- McMahon, S., Charbonneau, M., Grandmont, S., Richard, D.E. and Dubois, C.M. (2006) Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *J Biol Chem*, **281**, 24171-24181.
- Mekhail, K., Gunaratnam, L., Bonicalzi, M.E. and Lee, S. (2004) HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nat Cell Biol*, **6**, 642-647.
- Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J.H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W.Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W., Acker, H. and Fandrey, J. (2003) Intracellular localisation of human HIF-1  $\alpha$  hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci*, **116**, 1319-1326.
- Minet, E., Mottet, D., Michel, G., Roland, I., Raes, M., Remacle, J. and Michiels, C. (1999) Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 $\alpha$ -Hsp90 interaction. *FEBS Lett*, **460**, 251-256.

- Mole, D.R., Schlemminger, I., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Schofield, C.J. (2003) 2-oxoglutarate analogue inhibitors of HIF prolyl hydroxylase. *Bioorg Med Chem Lett*, **13**, 2677-2680.
- Myers, E.W., Sutton, G.G., Delcher, A.L., Dew, I.M., Fasulo, D.P., Flanigan, M.J., Kravitz, S.A., Mobarry, C.M., Reinert, K.H., Remington, K.A., Anson, E.L., Bolanos, R.A., Chou, H.H., Jordan, C.M., Halpern, A.L., Lonardi, S., Beasley, E.M., Brandon, R.C., Chen, L., Dunn, P.J., Lai, Z., Liang, Y., Nusskern, D.R., Zhan, M., Zhang, Q., Zheng, X., Rubin, G.M., Adams, M.D. and Venter, J.C. (2000) A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science*, **287**, 2196-2204.
- Nagao, M., Ebert, B.L., Ratcliffe, P.J. and Pugh, C.W. (1996) *Drosophila melanogaster* SL2 cells contain a hypoxically inducible DNA binding complex which recognises mammalian HIF-binding sites. *FEBS Lett*, **387**, 161-166.
- Nambu, J.R., Chen, W., Hu, S. and Crews, S.T. (1996) The *Drosophila melanogaster* similar bHLH-PAS gene encodes a protein related to human hypoxia-inducible factor 1 alpha and *Drosophila* single-minded. *Gene*, **172**, 249-254.
- Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1994) Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J Biol Chem*, **269**, 6320-6324.
- Ohh, M. and Kaelin, W.G., Jr. (1999) The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: new perspectives. *Mol Med Today*, **5**, 257-263.
- O'Rourke, J.F., Tian, Y.M., Ratcliffe, P.J. and Pugh, C.W. (1999) Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*, **274**, 2060-2071.
- Patton, E.E., Willems, A.R. and Tyers, M. (1998) Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet*, **14**, 236-243.
- Pause, A., Peterson, B., Schaffar, G., Stearman, R. and Klausner, R.D. (1999) Studying interactions of four proteins in the yeast two-hybrid system: structural resemblance of the pVHL/elongin BC/hCUL-2 complex with the ubiquitin ligase complex SKP1/cullin/F-box protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9533-9538.
- Pickart, C.M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*, **25**, 544-548.
- Piotrowski, J., Beal, R., Hoffman, L., Wilkinson, K.D., Cohen, R.E. and Pickart, C.M. (1997) Inhibition of the 26 S proteasome by polyubiquitin chains synthesized to have defined lengths. *J Biol Chem*, **272**, 23712-23721.
- Pongratz, I., Mason, G.G. and Poellinger, L. (1992) Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J Biol Chem*, **267**, 13728-13734.
- Pugh, C.W., JF, O.R., Nagao, M., Gleadle, J.M. and Ratcliffe, P.J. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*, **272**, 11205-11214.
- Rasmuson-Lestander, A. (1995) The *Drosophila* Stock Centers and their implications for developmental biology. *Int J Dev Biol*, **39**, 765-768.
- Reguly, T. and Wrana, J.L. (2003) In or out? The dynamics of Smad nucleocytoplasmic shuttling. *Trends Cell Biol*, **13**, 216-220.
- Reissmann, K.R. (1950) Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood*, **5**, 372-380.
- Reisz-Porszasz, S., Probst, M.R., Fukunaga, B.N. and Hankinson, O. (1994) Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Mol Cell Biol*, **14**, 6075-6086.
- Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D. and Pouyssegur, J. (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*, **274**, 32631-32637.

- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. and Dingwall, C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64**, 615-623.
- Roth, P., Xylourgidis, N., Sabri, N., Uv, A., Fornerod, M. and Samakovlis, C. (2003) The *Drosophila* nucleoporin DNup88 localizes DNup214 and CRM1 on the nuclear envelope and attenuates NES-mediated nuclear export. *J Cell Biol*, **163**, 701-706.
- Ruberte, E., Marty, T., Nellen, D., Affolter, M. and Basler, K. (1995) An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and thick veins, for dpp signaling in vivo. *Cell*, **80**, 889-897.
- Salceda, S., Beck, I., Srinivas, V. and Caro, J. (1997) Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia. *Kidney Int*, **51**, 556-559.
- Salceda, S. and Caro, J. (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, **272**, 22642-22647.
- Sato, K., Terada, K., Sugiyama, T., Takahashi, S., Saito, M., Moriyama, M., Kakinuma, H., Suzuki, Y., Kato, M. and Kato, T. (1994) Frequent overexpression of vascular endothelial growth factor gene in human renal cell carcinoma. *Tohoku J Exp Med*, **173**, 355-360.
- Scheffner, M. (1999) Moving protein heads for breakdown. *Nature*, **398**, 103-104.
- Schlesinger, D.H., Goldstein, G. and Niall, H.D. (1975) The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry*, **14**, 2214-2218.
- Schofield, C.J. and Zhang, Z. (1999) Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 722-731.
- Schuster, S.J., Badiavas, E.V., Costa-Giomi, P., Weinmann, R., Erslev, A.J. and Caro, J. (1989) Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood*, **73**, 13-16.
- Semenza, G.L., Neifelt, M.K., Chi, S.M. and Antonarakis, S.E. (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5680-5684.
- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M. and Wang, G.L. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **269**, 23757-23763.
- Semenza, G.L. and Wang, G.L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, **12**, 5447-5454.
- Shao, R., Zhang, F.P., Tian, F., Anders Friberg, P., Wang, X., Sjolund, H. and Billig, H. (2004) Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS Lett*, **569**, 293-300.
- Shih, S.C., Sloper-Mould, K.E. and Hicke, L. (2000) Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *Embo J*, **19**, 187-198.
- Sonnenfeld, M., Ward, M., Nystrom, G., Mosher, J., Stahl, S. and Crews, S. (1997) The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development*, **124**, 4571-4582.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L. and Finley, D. (1995) A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol*, **15**, 1265-1273.
- Spradling, A.C., Stern, D.M., Kiss, I., Roote, J., Laverty, T. and Rubin, G.M. (1995) Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10824-10830.
- Srinivas, V., Zhang, L.P., Zhu, X.H. and Caro, J. (1999) Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **260**, 557-561.
- Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C. and Weis, K. (1997) Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*, **90**, 1041-1050.
- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J. and Wahl, G.M. (1999) A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J*, **18**, 1660-1672.

- Strous, G.J. and Govers, R. (1999) The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci*, **112** ( Pt 10), 1417-1423.
- Swameye, I., Muller, T.G., Timmer, J., Sandra, O. and Klingmuller, U. (2003) Identification of nucleocytoplasmic cycling as a remote sensor in cellular signaling by databased modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1028-1033.
- Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. and Poellinger, L. (2000) Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J*, **19**, 4298-4309.
- Tian, H., McKnight, S.L. and Russell, D.W. (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, **11**, 72-82.
- To, K.K. and Huang, L.E. (2005) Suppression of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) transcriptional activity by the HIF prolyl hydroxylase EGLN1. *J Biol Chem*, **280**, 38102-38107.
- Torok, T., Tick, G., Alvarado, M. and Kiss, I. (1993) P-lacW insertional mutagenesis on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*: isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. *Genetics*, **135**, 71-80.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. and Semenza, G.L. (1995a) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5510-5514.
- Wang, G.L., Jiang, B.H. and Semenza, G.L. (1995b) Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*, **212**, 550-556.
- Wang, G.L., Jiang, B.H. and Semenza, G.L. (1995c) Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*, **216**, 669-675.
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993a) Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, **268**, 21513-21518.
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993b) Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*, **82**, 3610-3615.
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993c) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4304-4308.
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **270**, 1230-1237.
- Wappner, P., Gabay, L. and Shilo, B.Z. (1997) Interactions between the EGF receptor and DPP pathways establish distinct cell fates in the tracheal placodes. *Development*, **124**, 4707-4716.
- Ward, M.P., Mosher, J.T. and Crews, S.T. (1998) Regulation of bHLH-PAS protein subcellular localization during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, **125**, 1599-1608.
- Wen, W., Harootunian, A.T., Adams, S.R., Feramisco, J., Tsien, R.Y., Meinkoth, J.L. and Taylor, S.S. (1994) Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. *J Biol Chem*, **269**, 32214-32220.
- Whitelaw, M.L., McGuire, J., Picard, D., Gustafsson, J.A. and Poellinger, L. (1995) Heat shock protein hsp90 regulates dioxin receptor function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4437-4441.
- Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Maxwell, P.H. (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*, **92**, 2260-2268.
- Wizigmann-Voos, S., Breier, G., Risau, W. and Plate, K.H. (1995) Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res*, **55**, 1358-1364.
- Wood, S.M., Gleadle, J.M., Pugh, C.W., Hankinson, O. and Ratcliffe, P.J. (1996) The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells. *J Biol Chem*, **271**, 15117-15123.

- Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L. and Ratcliffe, P.J. (2000) Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene*, **19**, 6297-6305.
- Yu, F., White, S.B., Zhao, Q. and Lee, F.S. (2001) HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9630-9635.
- Yu, Z.K., Geyer, R.K. and Maki, C.G. (2000) MDM2-dependent ubiquitination of nuclear and cytoplasmic P53. *Oncogene*, **19**, 5892-5897.
- Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B.Z., Rubinstein, M. and Cohen, B. (1998) Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *Embo J*, **17**, 5085-5094.
- Zhang, Y. and Xiong, Y. (2001) A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science*, **292**, 1910-1915.