



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**"Regulación de la respuesta a hipoxia en *Drosophila*
mediante la exportación nuclear del Factor inducible
por Hipoxia, Sima"**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

Nuria Magdalena Romero

Director: Pablo Wappner

Consejero de Estudios: Ricardo A. Wolosiuk

Lugar de Trabajo: Fundación Instituto Leloir.

Instituto de Inv. Bioquímicas de Bs. As. - CONICET

Buenos Aires, 2008

Regulación de la respuesta a hipoxia en *Drosophila* mediante la exportación nuclear del Factor inducible por Hipoxia, Sima

El factor inducible por hipoxia, HIF (Hypoxia Inducible Factor) juega un papel central en la homeostasis del oxígeno y está conservado en el reino animal, desde nematodos hasta humanos. Es un factor de transcripción heterodimérico en el que ambas subunidades, HIF α y HIF β , pertenecen a la familia de proteínas bHLH-PAS. Mientras que la subunidad β es constitutiva, la subunidad α está regulada por oxígeno a varios niveles que incluyen el control de su estabilidad proteica, el reclutamiento de co-activadores transcripcionales y la regulación de su localización subcelular. Si bien estudios previos demostraron que HIF α se localiza en el citoplasma en normoxia y en el núcleo en hipoxia, las bases moleculares de esta regulación se desconocen. En esta tesis demostramos que la proteína Sima, homóloga de HIF α en *Drosophila*, se mueve continuamente entre el núcleo y el citoplasma. Identificamos dos señales de exportación nuclear (NESs) dentro del dominio bHLH de Sima que promueven la exportación nuclear de manera dependiente de CRM1, tanto en cultivos celulares como en embriones transgénicos. La mutagénesis sitio-dirigida de cualquiera de estas NESs provocó la acumulación de Sima en el núcleo, conduciendo a un incremento de la actividad transcripcional del heterodímero, sugiriendo que la exportación nuclear contribuye a la regulación de Sima. Encontramos que estas NES están conservadas y son funcionales en HIF-1 α humano, el cual también se mueve continuamente entre el núcleo y el citoplasma de manera dependiente de CRM1. Proponemos que la exportación de Sima es un paso importante en la regulación dependiente de oxígeno de la proteína y que su rápida exportación nuclear tras la reoxigenación contribuye a regular la duración de la respuesta celular a hipoxia. Finalmente, las NESs identificadas en el dominio bHLH están conservadas en muchas otras proteínas de la familia bHLH-PAS y nuestros resultados en cultivos celulares sugieren que dichas NESs podrían ser funcionales.

Hipoxia - HIF - Exportación Nuclear - *Drosophila*

The transcriptional response to hypoxia in *Drosophila* is regulated through nuclear export of the Hypoxia Inducible Factor, Sima.

Hypoxia-inducible factor (HIF) is a conserved heterodimeric transcription factor that plays a central role in oxygen homeostasis throughout the animal kingdom. It is composed of an α and a β subunit, both of them, members of the bHLH-PAS protein family. The HIF- α subunit is regulated by oxygen levels through several concurrent mechanisms that include protein stability, transcriptional co-activator recruitment and subcellular localization. It was previously reported that HIF α protein is mainly nuclear in hypoxia and cytoplasmic in normoxia but so far, the molecular basis of this regulation is unclear. We show here that the *Drosophila* HIF- α protein Sima shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. We have identified two nuclear export signals (NESs) in the Sima bHLH domain that promote CRM1-dependent nuclear export. Site directed mutagenesis of either NES provoked Sima nuclear retention and increased transcriptional activity, suggesting that nuclear export contributes to Sima regulation. We found that these NESs are conserved and functional in human HIF-1 α , which also shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm in a CRM1-dependent manner. We propose that Sima rapid nuclear export upon reoxygenation is a mechanism to regulate the duration of cellular responses to hypoxia. Finally, we have found that the NESs identified in the bHLH domain of HIF α /Sima are conserved in many other bHLH-PAS proteins throughout evolution, and our experiments in cell culture suggest that these NESs might be functional.

Hypoxia - HIF - Nuclear Export - *Drosophila*

Agradecimientos

En las primeras palabras de esta tesis quisiera agradecer a quienes me acompañaron durante estos años, a los que estuvieron desde el principio, a los que me alentaron a volver a empezar, a los que me ayudaron cuando lo intenté, a los que encontré en Buenos Aires, y a los que me sostuvieron durante este último año para poder cerrar esta etapa. Sin duda, mis sentimientos hacia cada uno de ellos excede esta tesis.

- A Pablo, mi director de tesis, por haber depositado tu confianza en mí casi cinco años atrás. Porque durante este tiempo me permitiste aprender, viajar a congresos, a cursos y formarme incluso en otros laboratorios. Porque me diste un espacio en el laboratorio para desarrollarme y sentirme libre de hacer. Por tu tiempo y discusiones. Por correr cuando yo lo necesitaba y esperarme cuando ya no daba más. Por haberte preocupado hasta de mis comidas y por haber elegido a los “chicos” del lab.

- A los “Chicos” del lab, a los viejos chicos (¿?) y a los chicos chiquitos (¿?). A Sofi que me enseñaste sin darte cuenta de la vida y me ayudaste al principio con tus pequeños detalles. A Lachi que con tu pasión nos divertiste durante mucho tiempo. A Maxi, que a pesar de los momentos difíciles pudimos entendernos. A Marian... Marian, que trataste de asustarme al principio con tu cara de seria pero con el tiempo me mostraste que de seria y de mala no tenés ni un poco. A Juancito (Mondote), gracias por tu mesada! A Andrés, mi compañero de mesada (robada) que a pesar de poner papelitos para tratar de tapar tuvimos que vernos la cara todos los días. A Juli, a Yuli y a Julietensen, que todavía no se si sos la chiquita de los viejos o la vieja de los chiquitos, pero casi casi compartí toda mi tesis con vos. A Juan, por que me enseñaste que no es tan importante si se mueren las moscas con dióxido y además que eso es algo que pueden hacer algunos pocos. A Agos, por tu paciencia, tus pilas, por transmitir tanto cariño y por tus mates (hasta por esos lavaditos!). A Joel, porque con tu enciclopedia inagotable de chistes malos me transmitiste mucha alegría cuando más la necesitaba. Y a Diego, por sumarte a la alegría del lab. A todos ustedes por estar.

- A los amigos de la vida en el lab. A Ceci, que se fue pero que aún sigue conmigo, gracias por lo que fue y por lo que será. A Jime, por tu energía para todo, porque fuiste una de las primeras personas que conocí cuando llegué a Buenos Aires y valió la pena! Gracias por levantarme aunque haya sido con el pretexto de hacer unas transgénicas y por compartir conmigo esta última corrida. A Vero P, a Clau y a Edgardo por los momentos que vivimos en un principio en el lab y ahora en la vida. Por los mates, asados y salidas que usé de pretexto para charlar con cada uno de ustedes.

- A los casi compañeros del 109: Paz, Caro, Santi, Lorena, Esteban, Ezequiel, Axel y Ana, que no dejan de sorprenderme... con el timbre!

- A los que encontré en Córdoba y que por suerte no perdí. A vos Cecy que estuviste siempre, que me enseñaste a vivir con tu ejemplo y no sólo dentro del lab. Porque me escuchaste, me aconsejaste y también compartiste conmigo. A “la Vale K” que me enseñaste que no hace falta demostrar para querer. A Folquiño, por transmitirme tu ingenuidad. A Fran que tiene todo mi cariño.

- Al Dr Maccioni y al Dr Beauge por ayudarme cuando me quedé en Pampa y la vía!

- A mis “consejeros” de tesis, que me escucharon y aconsejaron: Fernanda, Mario y Wolosiuk.

- Al CONICET por otorgarme la beca que me alcanzó para llegar a este punto de mi carrera.

- A la Fundación Instituto Leloir que, si bien nunca entendí si era una fundación, un instituto o simplemente Campomar, me permitió desarrollar mi tesis.

- A la Universidad de Buenos Aires por abrirme sus puertas y permitirme doctorarme.

- A Ana Cauherff y Ale Colman-Lerner, por ayudarme incondicionalmente. Por sus consejos, discusiones y por transmitirme parte de sus experiencias y conocimientos.

- A Christos Samakovlis por recibirme en su lab y permitir que conociera a Peggy. No me voy a olvidar tan fácil de ella, la pequeña personita que con sus locuras me hizo reír aún sin sol!

Pensé que no iba a poder empezar con los agradecimientos pero ahora que llego al final, no quiero terminar:

- A mis amigas de la vida, a Paula y a Vero que siempre estuvieron y van a estar presentes en mi vida. A Sandra que el destino o no se qué hizo que nos conociéramos y llegaste en el mejor momento. A Manu, por haberme ayudando a decidir a venir a Bs. As. y por haber estado en mi vida.

- A mis hermanos, a “la Caro”, a “la Paula” y “al Chicho” que siempre están conmigo aunque nos separamos hace mucho. Gracias por haberme dado los sobrinos más cariñosos y hermosos. A mi padre. Y a mi madre que siempre creyó tener los mejores hijos (¿!?!), por tu confianza y por tu amor.

Abreviaturas

CPRG: Rojo Clorofenol β -D-galactopiranosido

CPN: Complejo del poro nuclear

DNA: Acido Desoxirribonucleico

DNAc: Acido Desoxirribonucleico copia

Dys: Dysfusion

En: Engrailed

EPO: eritropoyetina

Fga: Fatiga

HIF: Hypoxia Inductible Factor

HRE: Hypoxia Response Element

LDH: Lactato deshidrogenasa

Luc: Luciferasa

NES: Señal de Exportación Nuclear

NLS: Señal de Localización Nuclear

ONPG: o-nitrofenil β -D-galactopiranosido

Pb: pares de bases

PHD: Prolyl Hydroxylase Domain

RNA: Acido Ribonucleico

RNA_m: RNA mensajero

Sim: Singled-minded

Sima: Similar

Tgo: Tango

Trh: Trachealess

VHL: Von Hippel Lindau

X-gal: 5-Bromo 4-Cloro 3-Indolyl β -D-galactopiranosido

INDICE	1-6
INTRODUCCIÓN	7-41
I- LA BIOLOGÍA DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>, EL MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO EN ESTA TESIS	
1- <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	7
2- El ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	8
3- El sistema respiratorio de <i>Drosophila</i>	10
II- HIPOXIA, HIF Y SU RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL ADAPTATIVA	
1-HIF: el regulador maestro de la homeostasis de oxígeno	12
1.1- <i>HIF es un heterodímero de dos proteínas bHLH-PAS</i>	12
1.1.1- <i>HIF-1α</i>	13
1.1.2- <i>HIF-1β</i>	14
2. Regulación dependiente de oxígeno de HIF	15
2.1- <i>Estabilidad proteica de HIF-1α</i>	15
2.1.1- <i>Ubiquitinación</i>	15
2.1.2- <i>Prolil hidroxilasas que modifican a HIF (PHDs)</i>	16
2.2- <i>Actividad transcripcional de HIF</i>	17
2.3- <i>Localización Subcelular de HIF</i>	18
3- Existencia en <i>Drosophila</i> de un sistema homólogo al sistema HIF de mamíferos	19
3.1- <i>Identificación de HIF-α y HIF-β de Drosophila (Sima y Tango)</i>	19
3.2- <i>Regulación de Sima por oxígeno</i>	21
3.2.1- <i>Estabilidad de la proteína Sima</i>	21
3.2.2- <i>Actividad transcripcional de Sima</i>	22
3.2.3- <i>Localización Subcelular de Sima</i>	23
III- TRANSPORTE DE PROTEÍNAS ENTRE EL NÚCLEO Y EL CITOPLASMA	
1- Complejo del poro nuclear (CPN)	25
2- Receptores de Transporte: Las Karioferinas	27
3- Ciclo Clásico de Importación Nuclear	28
3.1- <i>Señal de localización nuclear clásica (NLS)</i>	29

4- Ciclo Clásico de Exportación Nuclear	30
<i>4.1- Señales de Exportación Nuclear (NESs)</i>	31
5- Direccionalidad del transporte de proteínas y RanGTP	33
<i>5.1-El ciclo de RanGTP</i>	33
<i>5.2- Interpretación del gradiente Ran</i>	34
6- La unión de las Karioferinas a sus proteínas cargo	35
<i>6.1- Importina-α</i>	35
<i>6.1.1- Reconocimiento y unión a la cNLS</i>	35
<i>6.1.2- Regulación de la interacción entre la importina-α y la cNLS</i>	36
<i>6.1.3- Regulación de la interacción de la importina-β con la importina-α</i>	37
<i>6.2- CRM1</i>	37
<i>6.2.1- Reconocimiento y unión a la NES</i>	37
<i>6.2.2- Regulación de la interacción entre CRM1 y la NES</i>	40
<i>6.2.3- Efectos inhibitorios de la Leptomycin B (LMB) sobre CRM1</i>	40
OBJETIVOS	42
RESULTADOS	43-90
I- REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE SIMA	
1- Sima se mueve continuamente entre el núcleo y el citoplasma	43
2- La región N-terminal de Sima es necesaria para su localización citoplasmática.	45
3- Sima contiene dos motivos de unión a CRM1 en su región N-terminal.	46
4- La estructura secundaria predicha del dominio bHLH de Sima, donde se encuentran las presuntas NESs, cumple con los requerimientos necesarios para la interacción con CMR1.	47
5- Los motivos NESs del dominio bHLH de Sima son necesarios para su localización citoplasmática.	49
6- Sima se exporta rápidamente luego de la reoxigenación de los embriones	53
7- El dominio bHLH es necesario para la exportación nuclear de Sima	55
8- Identificación de las NESs funcionales de Sima	56
<i>8.1- Fusiones de las NES a EGFP y análisis de la localización subcelular en células S2</i>	56
<i>8.2- Análisis de la funcionalidad de las NESs en el contexto de la proteína entera en embriones transgénicos</i>	59

8.2.1- Efectos de la delección de la NES1 o la NES2 en la localización subcelular de Sima en embriones transgénicos	59
8.2.2- Efecto de mutaciones en la NES1 o la NES2 sobre la localización subcelular de Sima	61
8.2.3- Mutaciones en las presuntas NES3 o NES4 no tienen efecto sobre la exportación	63
II- LA EXPORTACIÓN DE SIMA COMO MECANISMO DE CONTROL DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA	
1- Diseño de nuevas mutantes de exportación en el dominio bHLH	64
2- Actividad transcripcional intrínseca de las variantes mutadas de Sima	65
3- Capacidad de heterodimerización de las mutaciones conservativas de Sima	66
3.1- Análisis de la interacción Sima-Tango en el sistema del doble híbrido de levaduras	66
3.1.1- Las mutantes de Sima (SimaF92Y; SimaL101A; SimaM115A; y SimaI124A) interaccionan correctamente con Tango.	68
3.2- Análisis de las interacciones entre Tango y las variantes mutagenizadas de Sima en ensayos de co-inmunoprecipitación	69
4- SimaL101A y SimaM115A tienen disminuida su capacidad de exportación	70
5- La disminución de la exportación nuclear de Sima conduce a un incremento de la actividad transcripcional	72
5.1- Análisis de los niveles de expresión SimaL101A y SimaM115A en líneas transgénicas	72
5.2- Análisis de la expresión del reportero transcripcional LDH-LacZ	73
5.3- Transactivación de genes endógenos	74
III- EFECTO DE TANGO SOBRE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE SIMA	
1- El aumento de los niveles de Tango no altera la localización de Sima, ni su cinética de exportación	76
1.2- La sobre-expresión de Tango no modifica la localización subcelular de Sima en el equilibrio	77
2- Ni la localización subcelular de Sima ni su cinética de exportación nuclear se modifican en el mutante Tgo ^{PY}	78
2.1- Caracterización del mutante Tgo ^{PY}	78
2.2- La localización subcelular de Sima no se modifica en el mutante Tgo ^{PY}	79

2.3- <i>La cinética de exportación de Sima no se encuentra alterada en el mutante Tgo^{PY}</i>	80
IV- REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE HIFα	
1- HIF1- α tiene dos motivos de unión a CRM1 en su dominio bHLH y HIF2 α tiene uno solo.	81
2- Capacidad del motivo HLH de HIF-1 α y HIF-2 α de dirigir la exportación nuclear de EGFP en células S2	82
3- La localización subcelular del HIF1 α humano depende de CRM1	84
3.1- <i>Sensibilidad a LMB de la localización de HIF1α</i>	84
3.2- <i>La NES1 y la NES2 del dominio bHLH de HIF1α son responsables de su sensibilidad a LMB</i>	85
V- CONSERVACIÓN EVOLUTIVA DE LA NES1 Y LA NES2 DENTRO DE LA FAMILIA bHLH-PAS	
1-Alineamiento de Secuencias	87
2- Evidencias de la funcionalidad de las NES predichas en el motivo HLH de otras proteínas de la familia bHLH-PAS	88
DISCUSIÓN	91-99
1- Regulación de la localización subcelular dependiente de oxígeno de HIF- α	91
1.1- <i>Sima es exportada del núcleo de manera dependiente de CRM1</i>	91
1.2- <i>El dominio bHLH de Sima y HIF-1α es necesario para la exportación nuclear</i>	92
1.3- <i>Dentro del dominio bHLH se encuentran dos NESs que participan en la exportación nuclear de Sima y HIF1-α</i>	93
1.4- <i>Mecanismos dependientes e independientes de CRM1 cooperan en la exportación de Sima</i>	93
1.5- <i>Regulación de la exportación mediada por niveles de oxígeno</i>	94
2- La exportación nuclear de HIF- α como mecanismo para controlar la actividad del factor de transcripción	95
3- Exportación vs. Degradación de HIF- α	97
4- Las dos señales de exportación nuclear están conservadas en el dominio bHLH de otras proteínas de la familia bHLH-PAS	98

CONCLUSIONES	100
MATERIALES Y MÉTODOS	101-115
1- Construcciones de DNA	101
<i>1.1-Construcciones utilizadas en células S2</i>	101
<i>1.2- Construcciones utilizadas para generar líneas transgénicas. Formas delecionadas o mutagenizadas de Sima</i>	103
<i>1.3- Construcciones de HIF utilizadas para experimentos en células de mamíferos</i>	104
<i>1.4- Construcciones empleadas en los ensayos de doble híbrido en levaduras</i>	105
2- Líneas celulares	105
<i>2.1- Células S2 de Drosophila. Mantenimiento, transfección y tratamientos farmacológicos</i>	105
<i>2.2- Células COS-7: Mantenimiento, transfección y tratamientos</i>	106
3- Medición de la actividad transcripcional de las mutantes de Sima en células S2	106
<i>3.1- Medición de actividad luciferasa</i>	107
<i>3.2- Medición de actividad β-galactosidasa a partir de extractos celulares</i>	107
<i>3.3- Normalización</i>	107
4- Líneas de moscas utilizadas	107
5- Moscas transgénicas	108
6- Cromosomas Balanceadores	108
7- Mapeo de las líneas transgénicas	109
8- Recombinación homóloga	109
9- Mantenimiento de Stocks	110
10- Recolección sincronizada de embriones y tratamientos de hipoxia	110
11- Inmunofluorescencia de embriones	110
12- Ensayo de actividad β-Galactosidasa en embriones	111
<i>12.1- CPRG</i>	111
<i>12.2- X gal</i>	111
13- Hibridización in situ de RNAs mensajeros	112
14- Ensayo de re-oxigenación	113
15- Análisis estadístico	113

<i>15.1- Análisis de la localización subcelular de las construcciones EGFP en células S2 de Drosophila</i>	113
<i>15.2- Análisis de la localización subcelular de variantes de Sima en embriones de Drosophila</i>	113
<i>15.2.1- En estado de equilibrio</i>	113
<i>15.2.2- Ensayos de re-oxigenación</i>	114
16- Experimentos de Doble Híbrido	114
<i>16.1- Cepas de levaduras</i>	114
<i>16.2- Cultivo de las levaduras</i>	114
<i>16.3- Transformación de las levaduras</i>	114
REFERENCIAS	116-125

INTRODUCCIÓN

Los organismos eucariota superiores han desarrollado a través de la evolución, diversas estrategias para adaptarse al aumento en los niveles de oxígeno que tuvo lugar 2400 millones de años atrás. La necesidad de mantener una adecuada oxigenación de los tejidos, sin que se produzcan especies tóxicas reactivas de oxígeno ha favorecido el desarrollo de mecanismos eficientes que regulan esta homeostasis a nivel celular y sistémico. De este modo, la supervivencia de las células y los tejidos pobremente oxigenados depende de la activación simultánea de toda una batería de procesos moleculares que generan cambios en la expresión génica o en la actividad de diversas proteínas.

I- LA BIOLOGÍA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*, EL MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO EN ESTA TESIS

Los procesos básicos de la biología celular generalmente se conservan evolutivamente en diversos organismos-modelo tales como gusanos, moscas, peces, ranas y mamíferos. Por este motivo, estudios genéticos en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* han permitido definir muchas de las principales moléculas y mecanismos que constituyen la base fundamental de la fisiología celular de los animales. Dada la creciente gama de herramientas genéticas disponibles en este modelo, el intenso uso que se le da a *Drosophila* en estudios de biología celular se ha incrementado notablemente en los últimos años.

1- *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Drosophila melanogaster es uno de los organismos superiores más extensamente estudiados, particularmente a nivel genético y genómico. Sus principales ventajas se centran fundamentalmente en la corta duración de su ciclo de vida, su abundante descendencia y su fácil cría y mantenimiento en condiciones de laboratorio, debidos en parte a sus reducidas dimensiones. Gracias al exhaustivo estudio de la genética de *Drosophila* durante el último siglo, ha sido posible acumular gran cantidad de información que acelera enormemente el ritmo de adquisición de nuevos conocimientos, merced a la disponibilidad de un creciente número de herramientas genéticas y moleculares. Uno de los avances más importantes en la biología de *Drosophila* se produjo en el año 2000 cuando se publicó la secuencia completa de su genoma (Adams y col. 2000). Este hecho, sumado a la mencionada disponibilidad de

herramientas genéticas y moleculares para su análisis, ha permitido consolidar a *Drosophila* como organismo modelo ideal para el empleo de estrategias genético-moleculares para la resolución de problemas de biología celular y del desarrollo. Otra de las grandes ventajas de *Drosophila* está dada por la facilidad para introducir y combinar mutaciones en su genoma. El genoma de *Drosophila* contiene relativamente poco DNA repetitivo y la mayoría de los genes son de copia única, reduciéndose de este modo los inconvenientes derivados de la redundancia funcional. Esta particularidad, junto con la posibilidad de insertar fácilmente material genético exógeno en el genoma de *Drosophila*, ha permitido la generación de diversas colecciones de mutantes, que constituyen una poderosa herramienta para analizar procesos biológicos complejos. Esta gran cantidad de información disponible sobre la Genética y la Biología de *Drosophila* ha propiciado la aparición de bases de datos accesibles a través de la Web entre las cuales se destacan:

- .FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>): Incluye datos genéticos y moleculares sobre *Drosophila*.
- .FlyBrain (<http://www.flybrain.org/>): Es una base de datos y atlas del sistema nervioso de *Drosophila*.
- .FlyView (<http://flyview.uni-muenster.de/>): Muestra una colección de patrones de expresión de genes durante el desarrollo (Janning 1997).

2- El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo o de metamorfosis completa (Martinez-Arias, 1993). Presenta tres estadios larvales seguidos de un estadio pupal y finalmente el estadio adulto (Figura 1). El ciclo de vida completo de *Drosophila* dura unos 12 días a 25°C. La ovogénesis que tiene lugar dentro del ovario de la hembra dura aproximadamente 3 días y medio. Una vez fecundado el huevo, la hembra lo deposita en una fruta en descomposición (en el laboratorio, sobre el medio de cultivo), iniciándose la embriogénesis. Es durante esta etapa cuando se determinan los ejes antero-posterior y dorso-ventral del cuerpo (Ingham 1988; Johnston y Nüsslein-Volhard 1992), se definen los 14 segmentos y se diferencian los distintos tipos celulares que darán origen a todos los órganos y tejidos. Al cabo de 24 horas, la arquitectura general del organismo ha quedado definida, sus órganos y tejidos han terminado de formarse y el embrión eclosiona, dando lugar a una larva que se alimenta activamente, incrementando dramáticamente su masa corporal. Existen 3 estadios larvales (LI, LII y LIII), durante los cuales el activo incremento de tamaño continúa.

Durante este período las células larvales básicamente no proliferan, sino que simplemente aumentan de tamaño. Durante los estadios larvales se registra una activa síntesis de proteínas sustentada en parte en la endoreplicación de su material genético. Cinco días luego de la ovipuesta, la larva abandona el alimento, se inmoviliza sobre un sustrato seco y su cutícula se torna rígida y resistente dando lugar al pupario, dentro del cual tendrá lugar todo el proceso de la metamorfosis. Durante la metamorfosis, la mayoría de los tejidos larvales son histolizados y las estructuras adultas se forman principalmente a partir de los discos imaginales, y de los histoblastos. Finalmente, se deposita la cutícula del adulto dando lugar al adulto formado que abandona el pupario varios días después, convirtiéndose en adulto exarado de vida libre. Pocas horas luego de la emergencia, la mosca adulta alcanza la madurez sexual y se inicia nuevamente el ciclo de vida.

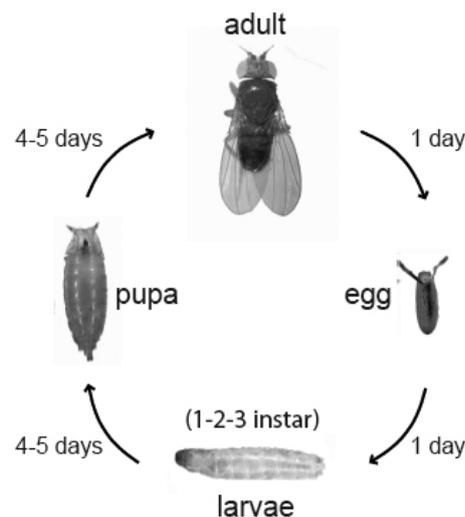


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* a 25°C. Luego de 24 horas de desarrollo embrionario, la larva eclosiona del huevo. Cinco días más tarde, las larvas forman el pupario donde ocurre la metamorfosis (estadio de pupa). Las estructuras del adulto se forman a partir de los discos imaginales. El adulto finalmente eclosiona 4-5 días después de la pupariación. (Tomado de Romero y col, *Methods and Enzimology*, 2007.)

En la naturaleza, los adultos de *Drosophila melanogaster* proliferan en zonas con abundantes frutas en descomposición, alimentándose de su jugo y de las levaduras que crecen sobre éstas. Los huevos son depositados sobre la superficie de estas frutas y una vez que eclosionan las

larvas, éstas se sumergen dentro de la fruta donde compiten con otros microorganismos por los limitados niveles de oxígeno presentes debido a la fermentación.

3- Sistema respiratorio de *Drosophila*

El sistema circulatorio de insectos es rudimentario y está integrado básicamente por un solo vaso dorsal que desempeña el papel de un corazón primitivo. En el insecto, la sangre (hemolinfa) no circula a través de venas y arterias sino que llena la cavidad corporal proveyendo los nutrientes a los órganos y tejidos. El transporte de gases (entrega del oxígeno y remoción del dióxido de carbono) no depende del primitivo sistema circulatorio, sino que los gases alcanzan directamente los órganos y tejidos del organismo a través del sistema respiratorio, denominado sistema traqueal (Ghabrial et al., 2003). El aire ingresa al cuerpo del insecto a través de orificios llamados espiráculos que están conectados directamente a una red compleja de tubos ramificados, las tráqueas (Samakovlis y col., 1996), las cuáles proporcionan el oxígeno a cada célula o tejido del organismo (Figura 2).



Figura 2. Vista Dorso-Lateral del Sistema Traqueal de la larva de *Drosophila*. El aire ingresa a través de los espiráculos (punta de flecha) y alcanza las células del cuerpo a través del sistema traqueal. Las flechas señalan las ramas principales del sistema traqueal.

Durante la embriogénesis tiene lugar el desarrollo traqueal a través de un mecanismo estereotipado de migración celular. Este proceso depende principalmente de la actividad quimiotáctica del homólogo del factor del crecimiento de fibroblastos de la mosca (FGF), Branchless (Bnl) (Sutherland et al., 1996), el cual se expresa en tejidos blanco fuera de las tráqueas, atrayendo la extensión de las ramas traqueales. Bnl interacciona con el homólogo del receptor de FGF, Breathless (Btl) (Dossenbach et al., 2001; Klambt et al., 1992; Reichman-Frito et al., 1994; Reichman-Frito y Shilo, 1995), el cual se expresa en las células

traqueales gracias a la actividad del heterodímero formado por dos proteínas bHLH-PAS, Trachealess y Tango. Btl interactúa con Bnl y envía la señal hacia el interior celular provocando modificaciones en el citoesqueleto que inducen cambios en la forma de la célula dando como resultado final, la migración celular dirigida. Este proceso tiene características comunes con el desarrollo de los vasos sanguíneos de los mamíferos, donde la migración del primordio del vaso sanguíneo es dirigida por la expresión de diversas isoformas del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) que interactúan con los receptores de membrana de las células epiteliales (Metzger y Krasnow, 1999; Wappner y Ratcliffe, 2001)(Romero y col., 2007).

En las etapas larvales, las ramas traqueales terminales se tornan plásticas, teniendo la capacidad de emitir proyecciones hacia los tejidos circundantes deprivados de oxígeno, de manera similar a lo que ocurre en mamíferos durante la angiogénesis (Jarecki et al., 1999)(Centanin y col., 2008). Esta respuesta dependiente de hipoxia de las células traqueales terminales también está mediada por Bnl, que se expresa en tejidos hipóxicos, y su receptor, Btl, expresado en células traqueales. Este comportamiento del sistema traqueal de *Drosophila* es dependiente de los niveles de oxígeno y notablemente similar a la angiogénesis en mamíferos (Metzger y Krasnow, 1999; Wappner y Ratcliffe, 2001)(Romero y col., 2007) donde VEGF se induce en células deprivadas de oxígeno, promoviendo el crecimiento de nuevos capilares sanguíneos que irrigarán los tejidos hipóxicos.

II- HIPOXIA, HIF Y SU RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL ADAPTATIVA

En mamíferos, la homeostasis del oxígeno está finamente controlada para asegurar que este gas sea suficiente para cubrir los requerimientos metabólicos pero evitando la alta toxicidad del oxígeno debido a la producción de radicales libres. Este fino control homeostático ocurre no sólo a nivel sistémico, sino también a nivel celular. Una de las adaptaciones más importantes que se dispara tras la disminución de la tensión de oxígeno es el cambio de un metabolismo aeróbico a la glicólisis anaeróbica, proceso que está mediado en parte por la inducción de la expresión de enzimas glicolíticas y transportadores de glucosa. A nivel sistémico, ocurren otros cambios adaptativos que ayudan a incrementar el suministro de oxígeno; éstos incluyen la inducción de la eritropoyesis, la angiogénesis y la respuesta hiperventilatoria. Entre los principales cambios adaptativos en respuesta a hipoxia se destacan la inducción de eritropoyetina (EPO; hormona que induce la maduración de los eritrocitos) y VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular), que median la eritropoyesis y la angiogénesis respectivamente. La inducción dependiente de hipoxia de estos reguladores, como así también la de otras proteínas que median la adaptación a hipoxia, ocurre principalmente a nivel transcripcional y está mediada por el Factor Inducible por Hipoxia (HIF; Hypoxia-Inducible Factor).

1-HIF: el regulador maestro de la homeostasis del oxígeno

El descubrimiento de HIF como regulador global de la homeostasis del oxígeno surgió de la búsqueda del factor responsable de la inducción transcripcional de EPO en respuesta a hipoxia (Goldberg y col., 1988; Semenza y col., 1991). Se identificó, en la región 3' no codificante del gen EPO, una secuencia de DNA que funcionaba como elemento de respuesta a hipoxia (HRE)(Maxwell y col., 1993). Posteriormente, se identificó a HIF-1 como el factor nuclear inducible por hipoxia capaz de unirse a estos HRE (Semenza y Wang, 1992; Wang y Semenza, 1993; Wang y Semenza, 1995).

1.1- HIF es un heterodímero de dos proteínas bHLH-PAS

HIF es un factor heterodimérico compuesto por una subunidad α y una subunidad- β (Wang y col., 1995; Wang y Semenza, 1995). Como todas las proteínas de la familia bHLH-PAS, ambas subunidades, HIF- α y HIF- β , presentan hacia el N-terminal un dominio bHLH (basic Helix-Loop-Helix) y un dominio PAS (Per-RNAT-Sim) (Huang y col., 1993). El nombre del dominio PAS proviene de las siglas de los primeros miembros conocidos de la familia: las proteínas de *Drosophila* Period (Per) y Single-minded (Sim) y la proteína de mamíferos Arnt (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator), también conocida como HIF- β . (Wang y

col., 1995). El dominio PAS, que participa en interacciones proteína-proteína se divide en dos subdominios denominados PAS-A y PAS-B (Semenza, 2007). La región HLH y el dominio PAS tienen participación en la formación del heterodímero entre ambas subunidades. La unión al DNA del factor de transcripción está mediada por la región básica del dominio bHLH (Jiang y col., 1996). A lo largo de todo el árbol filogenético, incluyendo procariotas, se han identificado proteínas que contienen tanto el dominio bHLH como el dominio PAS, lo cual implica que se trata de una familia de proteínas evolutivamente muy antigua (Morgenstern y Atchley, 1999; Wang y col., 1995).

En mamíferos, existen distintas subunidades- α de HIF cuya estructura básica y regulación son similares pero que difieren tanto en su función (Carroll y Ashcroft, 2006) como en su patrón de expresión (Gu y col., 1998; Hirota y Semenza, 2005; Tian y col., 1997). La expresión de HIF-1 α es ubicua y la de sus parálogos, HIF-2 α y HIF-3 α está más restringida a tejidos particulares (Gu y col., 1998; Hirota y Semenza, 2005; Semenza, 2007; Tian y col., 1997).

1.1.1- HIF-1 α

HIF-1 α es una proteína de 826 aminoácidos (120kDa) (Figura 3); su dominio bHLH está constituido por un motivo básico (residuos 17-30) seguido por el motivo HLH (residuos 31 a 71) y el dominio PAS (residuos 85 a 298) está formado por los subdominios PAS A (residuos 85 a 158) y PAS B (residuos 228 a 298) (Wang y col., 1995). HIF- α contiene dos señales de localización nuclear predichas; la N-NLS (residuos 17 a 74) y la C-NLS (residuos 720 a 758). En el contexto de la proteína entera la C-NLS que es una señal bipartita, demostró ser crucial para la importación nuclear de HIF-1 α , mientras que la N-NLS no sería necesaria para el ingreso de la proteína al núcleo (Kallio y col., 1998; Luo y Shibuya, 2001). En la mitad C-terminal de HIF-1 α se hallan dos dominios de transactivación ricos en glutaminas que han sido denominados N-TAD (residuos 531 a 584) y C-TAD (residuos 786 a 826) (Pugh y col., 1997). La parte C-terminal de la proteína contiene un dominio que media la degradación de HIF-1 α en condiciones de normoxia (Huang y col., 1998). Este dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD- Oxygen dependent Degradation Domain; residuos 401 a 603) contiene dos motivos PEST: secuencias ricas en prolinas (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T) (residuos 499 a 518 y 581 a 600) común en proteínas que poseen un tiempo de vida media corto (Rechsteiner y Rogers, 1996) y contiene además residuos de prolina que son clave para la regulación de la estabilidad de la proteína de manera dependiente de oxígeno (ver mas abajo). El tiempo medio de vida de HIF1- α en condiciones de normoxia es inferior a diez minutos, siendo la proteína difícilmente detectable en estas condiciones (Chun y col., 2002).



Figura 3. Dominios estructurales y funcionales de HIF-1 α . En la región N-terminal se encuentran los dominios bHLH y PAS, mientras que en la región C-terminal está el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) y los dos dominios de transactivación (N-TAD y C-TAD). También se muestran las dos prolinas (P402 y P564) y la asparragina (A803) susceptibles a hidroxilación y la señal de localización nuclear funcional (C-NLS).

1.1.2- HIF-1 β

HIF1- β fue identificado previamente como el translocador nuclear del receptor de compuestos aril hidrocarbonados (Arnt), el cual puede formar heterodímeros con varias otras proteínas bHLH-PAS, tales como el receptor de compuestos aril hidrocarbonados (AHR) y las proteínas Single-Minded (SIM-1 y SIM-2). Se ha podido determinar que a bajas concentraciones de oxígeno, se favorece la formación del heterodímero HIF- α /HIF- β por sobre todos los demás heterodímeros posibles debido a la mayor afinidad que HIF- β posee por HIF- α (Gradin y col., 1996).

Por su parte, HIF- β presenta dos isoformas de 774 y 789 aminoácidos (92 y 94 kDa respectivamente) generadas por *splicing* alternativo que difieren en la inclusión de un exón de 45 pares de bases (Wang y col., 1995). El significado funcional de estas dos isoformas no ha sido dilucidado. HIF- β contiene una señal de localización nuclear en la región N-terminal (aminoácidos 36 a 61) que media su entrada al núcleo (Eguchi y col., 1997) y una región rica en glutaminas en su parte C-terminal que podría dirigir la transcripción en condiciones de homodimerización (Antonsson y col., 1995; Sogawa y col., 1995), aunque no hay evidencias de que esto ocurra en un contexto fisiológico. Interessantemente, se ha reportado que cuando HIF- β dimeriza con AhR se silencia el dominio de transactivación de HIF- β (Ko y col., 1996).

2. Regulación dependiente de oxígeno de HIF

El complejo mecanismo de regulación por oxígeno que opera sobre HIF depende de su subunidad α e involucra principalmente cambios en su estabilidad proteica, regulación de la actividad transcripcional y modulación de la localización subcelular. Se han descrito también cambios en la expresión del mRNA y regulación a nivel de *splicing* alternativo de ambas subunidades (Gothie y col., 2000; Wang y col., 1995; Wiener y col., 1996; Yu y col., 1998).

2.1- Estabilidad proteica de HIF-1 α

Uno de los principales avances en el campo de la hipoxia fue la dilucidación del mecanismo molecular por el cual las células sensan los niveles de oxígeno y traducen esta señal a cambios en la estabilidad proteica de HIF α . Inicialmente, análisis bioquímicos mostraron que la vida media de HIF-1 α en condiciones de normoxia (21% de oxígeno) era muy corta, mientras que en hipoxia (por ejemplo, 1% O₂) se inhibía la degradación proteica provocando acumulación de la proteína (Huang y col., 1998). Experimentos con inhibidores del proteasoma permitieron determinar que HIF1- α es degradado en condiciones de normoxia en el proteasoma de 26S vía ubiquitinación (Huang y col., 1998; Kallio y col., 1999; Salceda y Caro, 1997; Sutter y col., 2000).

2.1.1-Ubiquitinación

La proteína supresora de tumores de von Hippel-Lindau (VHL) juega un papel central en la ubiquitinación de HIF- α a través de su interacción directa con el ODDD de la subunidad α (Bonicalzi y col., 2001; Maxwell y col., 1999). Mutaciones que afectan a VHL son responsables del síndrome de von Hippel-Lindau, caracterizado por la predisposición al desarrollo de tumores altamente vascularizados. Se ha determinado que ello se debe a altos niveles de HIF- α en estos tumores (Maxwell y col., 1999), lo que provoca la expresión constitutiva de una amplia gama de genes inducibles por hipoxia, incluyendo VEGF (Morii y col., 1993; Takahashi y col., 1994).

VHL funciona como la subunidad de reconocimiento del sustrato dentro de un complejo E3 ubiquitin ligasa, del que también forman parte las proteínas elongina B y C, culina 2, y Rbx1 (Bonicalzi y col., 2001; Cockman y col., 2000; Kamura y col., 2000; Maxwell y col., 1999; Ohh y col., 2000; Tanimoto y col., 2000). La interacción física entre VHL y HIF- α depende de la presencia de oxígeno: VHL se asocia al ODDD en condiciones de normoxia pero no en hipoxia y por dicho motivo, la ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma de 26S está inhibida en hipoxia (Kallio y col., 1999; Maxwell y col., 1999). La unión de VHL al ODDD y posterior ubiquitinación en su región N- y C-terminal (aminoácidos 390-417 y 549 a

582, respectivamente) (Hon y col., 2002), requiere de la hidroxilación de dos residuos de prolina (P402 y P564, figura 3A)(Bruick y McKnight, 2001; Jaakkola y col., 2001). Estos residuos se encuentran dentro de una secuencia conservada, LXXLAP, donde la presencia de las leucinas es necesaria para que la prolina pueda ser hidroxilada. La reacción de hidroxilación está catalizada por una serie de prolil-4-hidroxilasas que utilizan al oxígeno molecular como co-sustrato para la catálisis (Epstein y col., 2001; Ivan y col., 2001).

2.1.2- Prolil hidroxilasas que modifican a HIF (PHDs)

Como se ha mencionado, la hidroxilación de los residuos de prolina en el ODDD de HIF- α está catalizada por prolil 4-hidroxilasas de la familia de las dioxigenasas que requieren oxígeno, 2-oxoglutarato y hierro (II) para la catálisis (Bruick y McKnight, 2001; Jaakkola y col., 2001). La enzima responsable de la hidroxilación de estas prolinas de HIF α fue descubierta inicialmente en *Caenorhabditis elegans*, estando codificada por el gen *egl-9* (Epstein y col., 2001). Los gusanos mutantes para *egl-9*, al igual que los mutantes para *vhl*, presentan niveles constitutivamente elevados de proteína HIF- α . Se identificaron tres homólogos de EGL-9 en mamíferos, a los que se denominó PHD1, PHD2 y PHD3 (proteínas con Dominios Prolil Hidroxilasa- PHD) (Bruick y McKnight, 2001; Epstein y col., 2001; Ivan y col., 2001). Estas proteínas difieren en su localización subcelular: PHD1 es exclusivamente nuclear, PHD2 es citoplasmática y PHD3 está en ambos compartimentos (Metzen y col., 2003). Las tres hidroxilasas demostraron ser capaces de modificar la prolina 564 pero sólo PHD1 y PHD2 hidroxilan a la prolina 402 (Hirota y Semenza, 2005; Huang y col., 2002; Masson y Ratcliffe, 2003; Masson y col., 2001). El oxígeno molecular es uno de los dos sustratos de estas enzimas (el otro es 2-oxoglutarato), mientras que dióxido de carbono y succinato, además de la prolina hidroxilada, son los productos de la reacción. En condiciones de hipoxia, o en casos de disminución de los niveles de hierro o de 2-oxoglutarato, las PHDs dejan de funcionar y de esta manera, HIF-1 α no es degradado, acumulándose en la célula (Figura 4) (Schofield y Ratcliffe, 2005).

Interesantemente, PHD2 y PHD3 son fuertemente inducidas en hipoxia, mientras que los niveles del transcripto de PHD1 se mantienen constantes (Appelhoff y col., 2004; Epstein y col., 2001). De hecho, ambas hidroxilasas, PHD2 y PHD3, son blancos transcripcionales de HIF, generándose un circuito de retroalimentación negativa (Berra y col., 2001a; del Peso y col., 2003) que limita la respuesta transcripcional a hipoxia.

2.2- Actividad transcripcional de HIF

HIF debe unirse a las secuencias HRE de los *enhancers* de sus genes-blancos y reclutar coactivadores transcripcionales para poder inducir la transcripción. La actividad transcripcional de HIF está también regulada por oxígeno. El dominio TAD de HIF- α recluta los coactivadores transcripcionales, p300/CBP que se unen a HIF- α a través de su dominio CH1 (rico en cisteínas e histidinas) (Gu y col., 2001), reclutando otros coactivadores que incluyen a SRC-1, TIF-2 y Ref-1 (Ema y col., 1999).

Como se mencionó más arriba, el mecanismo de regulación dependiente de oxígeno del reclutamiento de coactivadores depende de la hidroxilación de una asparragina ubicada dentro del dominio C-TAD (N803). Esta hidroxilación impide la interacción con p300/CBP bloqueando la transcripción (Lando y col., 2002b) (Figura 4). En hipoxia, la hidroxilación de la asparragina no tiene lugar y en consecuencia, p300/CBP puede interactuar con el C-TAD permitiendo que el complejo transcripcional se ensamble. La enzima responsable de la hidroxilación de la Asn es, al igual que las PHDs, una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato y hierro (II), la cual fue denominada FIH (Mahon y col., 2001) (Hewitson y col., 2002; Lando y col., 2002a).

La inhibición de la hidroxilación de ambos tipos de residuos, las prolinas dentro del ODDD y la asparragina del dominio C-TAD, es necesaria para que la activación de HIF en respuesta a hipoxia sea máxima (Lando y col., 2002a). El reemplazo de las prolinas dentro del ODDD resulta en una proteína estable aún en condiciones de normoxia, pero que presenta una actividad transcripcional mucho más baja en normoxia que en hipoxia (Lando y col., 2002a). La sustitución de la asparragina dentro del dominio T-CAD no altera por sí misma la actividad de HIF debido a que, a pesar de reclutar constitutivamente a los co-activadores transcripcionales, la proteína se degrada de todos modos en normoxia. Finalmente, una doble mutante de HIF α , en la que tanto las prolinas como la asparragina han sido reemplazadas por residuos de alanina, presenta actividad máxima aún en condiciones de normoxia (Lando y col., 2002a).

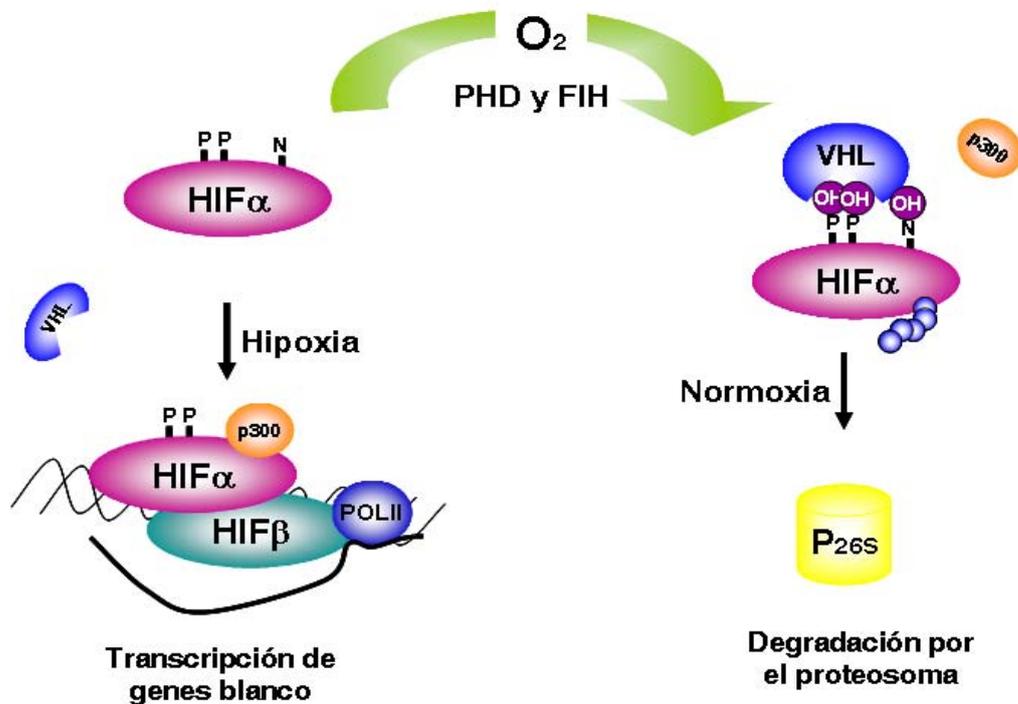


Figura 4. La regulación de HIF por el oxígeno ocurre a través de la subunidad α . Dentro de la subunidad- α existen tres sitios susceptibles a ser hidroxilados: dos prolinas en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) y una asparragina en el dominio C-terminal de transactivación (C-TAD). En presencia de oxígeno molecular (O_2), estos tres residuos son hidroxilados por las enzimas PHD y FIH respectivamente. La hidroxilación de las prolinas permite la unión a VHL, el cual media la ubiquitinación y posterior destrucción en el proteosoma de 26S. La hidroxilación de la asparragina, bloquea la interacción con P300/CBP, disminuyendo la actividad transcripcional. Cuando los niveles de oxígeno disminuyen, las hidroxilasas no son capaces de actuar sobre la subunidad α , evadiéndose la degradación y permitiendo la unión a p300/CBP. Esto posibilita la formación del heterodímero con la subunidad- β y la subsecuente activación de la transcripción de los genes blanco.

2.3- Localización Subcelular de HIF

Para unirse al DNA y activar la transcripción, obviamente es necesario que el heterodímero HIF- α /HIF- β se localice en el núcleo (Kallio y col., 1997). La localización subcelular de HIF- α depende de los niveles de oxígeno; en normoxia, HIF- α se localiza mayormente en el citoplasma, mientras que en hipoxia se encuentra concentrado en el núcleo (Kallio y col., 1998). Si bien, se sugirió que la importación nuclear ocurriría exclusivamente en hipoxia, el mecanismo involucrado no pudo ser dilucidado (ver más adelante).

La importación nuclear de HIF- α y HIF- β está mediada por la vía clásica de importina- α /importina- β . Tanto HIF- α como HIF- β se unen independientemente a importina- α , la cual, unida a importina- β , facilita la entrada al núcleo de los complejos conteniendo HIF α o HIF β . La unión de HIF- α a la importina- α depende de su señal de localización nuclear C-terminal (C-NLS) (Depping y col., 2008). Hasta la realización de esta tesis, se desconocía el mecanismo de exportación nuclear de HIF- α y de hecho, no se habían identificado señales de exportación (NES) que puedan ser reconocidas por CRM1. Se sugirió sin embargo, que en condiciones de reoxigenación, HIF-1 α es inicialmente ubiquitinado en el núcleo y posteriormente exportado al citoplasma en un proceso dependiente de VHL (Groulx y Lee, 2002). Se reportó también que esta exportación es insensible al tratamiento con LMB, sugiriendo que esta vía de exportación es independiente de CRM1.

3- Existencia en *Drosophila* de un sistema homólogo al sistema HIF de mamíferos

3.1-Identificación de Sima y Tango como los homólogos de HIF- α y HIF- β en *Drosophila*

La existencia en *Drosophila* de un sistema homólogo a HIF fue inicialmente inferida mediante de ensayos en geles de retardo (EMSA). Extractos nucleares preparados a partir de células S2 de *Drosophila* fueron incubados con oligonucleótidos derivados de los *enhancers* de genes de mamíferos que se inducen en hipoxia (HRE), dando lugar a la formación de complejos inducibles por hipoxia y sugiriendo por lo tanto, la existencia en *Drosophila* de una proteína nuclear endógena capaz de interactuar con dichos enhancers (Nagao y col., 1996). En la misma época, se identificó en *Drosophila* un gen de expresión ubicua que codificaba para un factor de la transcripción de 1505 aminoácidos perteneciente a la familia bHLH-PAS, el cual estaba estructuralmente relacionado con HIF- α de mamíferos, por lo que fue denominado *Similar (Sima)* (Nambu y col., 1996).

Sima es notablemente más grande que cualquier proteína HIF- α de mamíferos descrita hasta el momento, exhibiendo un peso molecular aproximado de 180kDa. A nivel de aminoácidos, presenta una identidad con el HIF-1 α humano del 45% en el dominio de PAS y del 63% en el dominio bHLH (Figura 5). La primera evidencia de que Sima podría ser un homólogo funcional de HIF α fue reportada poco tiempo más tarde. Sima es prácticamente indetectable en células S2 en normoxia pero en hipoxia severa, los niveles de la proteína suben dramáticamente (Bacon y col., 1998). Más recientemente, nuestro grupo llevó a cabo una caracterización más detallada de la maquinaria de respuesta a hipoxia in vivo, en embriones de *Drosophila* (Lavista-Llanos y col., 2002). En embriones, los niveles de la proteína Sima son demasiado bajos para ser detectados en normoxia por inmunofluorescencia, mientras que en hipoxia severa la proteína puede ser observada en el núcleo de las células del

sistema traqueal. Estudios posteriores permitieron determinar que al igual que en HIF- α de mamíferos (Huang y col., 1998; Jiang y col., 1997; Maxwell y col., 1999; Pugh y col., 1997), la regulación de Sima ocurre a nivel de la estabilidad de la proteína, donde un dominio central es responsable de la degradación dependiente de oxígeno (Bacon y col., 1998) (Lavista-Llanos y col., 2002).

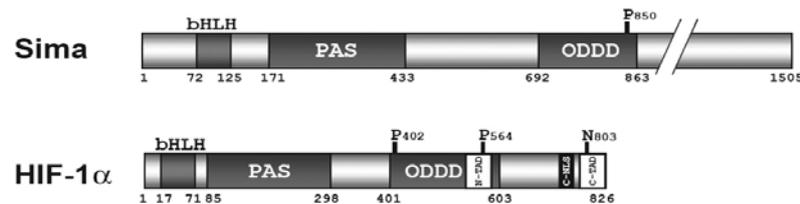


Figura 5. Representación esquemática de la proteína HIF- α humana y de su homólogo en *Drosophila*, Sima. Se muestran los dominios bHLH, PAS y ODDD. Dentro del ODDD están marcadas las prolinas susceptibles a hidroxilación dependiente de oxígeno.

El homólogo de HIF- β en *Drosophila* fue identificado aproximadamente al mismo tiempo que Sima y fue denominado Tango debido a que, como ocurre con HIF- β en células de mamíferos, además de formar un heterodímero con Sima, puede formar “pareja” con varias otras proteínas bHLH-PAS de *Drosophila* (Ma y Haddad, 1999; Ohshiro y Saigo, 1997; Sonnenfeld y col., 1997; Zelzer y col., 1997). Estas proteínas bHLH-PAS incluyen a Tracheless - implicado en el desarrollo traqueal (Wilk y col., 1996)-; Dysfusion -necesario para la diferenciación de las células de fusión en la tráqueas (Jiang y Crews, 2003; Jiang y Crews, 2006)-; Singled minded -que participa en la diferenciación de células de la glia (Nambu y col., 1991)- y Aristapedia -que controla el desarrollo de las antenas (Crews y Fan, 1999; Emmons y col., 1999)-. Estudios funcionales en células S2 y en embriones de *Drosophila* llevados a cabo por nuestro y otros laboratorios confirmaron que Sima y Tango son indispensables para inducir la respuesta transcripcional a hipoxia (Bruick y McKnight, 2001; Centanin y col., 2008; Centanin y col., 2005; Dekanty y col., 2005; Gorr y col., 2004; Lavista-Llanos y col., 2002). Por otra parte, coincidiendo con lo ya descrito en mamíferos, la interacción entre Sima y Tango es directa y está mediada por sus dominios bHLH y PAS (Sonnenfeld y col., 1997).

La expresión de la proteína Tango es ubicua en todos los tejidos de *Drosophila* a lo largo del desarrollo pero interesantemente, la proteína se encuentra localizada en el citoplasma a menos

que Tracheless o Single minded, con las que heterodimeriza, se coexpresen en la misma célula. En ese caso, ambas subunidades, Tango y la correspondiente subunidad- α , se localizan en el núcleo induciendo la transcripción de genes blanco. Se propuso que este mecanismo de regulación de la localización subcelular de Tango podría ser un principio general aplicable a todas las subunidades- α de *Drosophila* (Ward y col., 1998).

3.2- Regulación de Sima por oxígeno

3.2.1- Estabilidad de la proteína Sima

Como se ha mencionado, al igual que en mamíferos, la proteína HIF- α de *Drosophila*, Sima, es regulada por oxígeno a nivel de la degradación de la proteína (Gorr y col., 2004). Se identificó un dominio central ubicado entre los aminoácidos 692 y 863, que media la degradación dependiente de oxígeno (ODDD) (Lavista-Llanos y col., 2002) (Figura 5). En concordancia con esto, se identificó en *Drosophila* un gen homólogo a VHL que reconoce a Sima y forma parte de un complejo E3 ubiquitin ligasa junto con los homólogos de Cul-2, Rbx1 y las Elonginas B y C (Aso y col., 2000).

Dentro del dominio ODDD se identificó un único residuo de prolina susceptible a ser hidroxilado (P850) (Arquier y col., 2006; Centanin y col., 2008; Jaakkola y col., 2001) por la prolil hidroxilasa de *Drosophila* homóloga a las PHDs de mamíferos (Bruick y McKnight, 2001; Epstein y col., 2001; Lavista-Llanos y col., 2002). El gen que codifica la prolil hidroxilasa fue estudiado en profundidad en nuestro laboratorio y denominado *fatiga* (Centanin y col., 2005) (Figura 6). El silenciamiento de *fatiga* mediado por RNAi provoca la acumulación constitutiva de la proteína Sima en normoxia tanto en cultivos de células (Bruick y McKnight, 2001) como en embriones de *Drosophila* (Lavista-Llanos y col., 2002). Además, en el laboratorio se generaron una serie de alelos mutantes para *fatiga* en los cuales se acumula la proteína Sima aún en condiciones de normoxia (Centanin y col., 2005). Estos mutantes muestran la inducción constitutiva de reporteros transcripcionales inducibles por hipoxia, como así también de genes blanco dependientes de Sima (Centanin y col., 2008; Centanin y col., 2005).

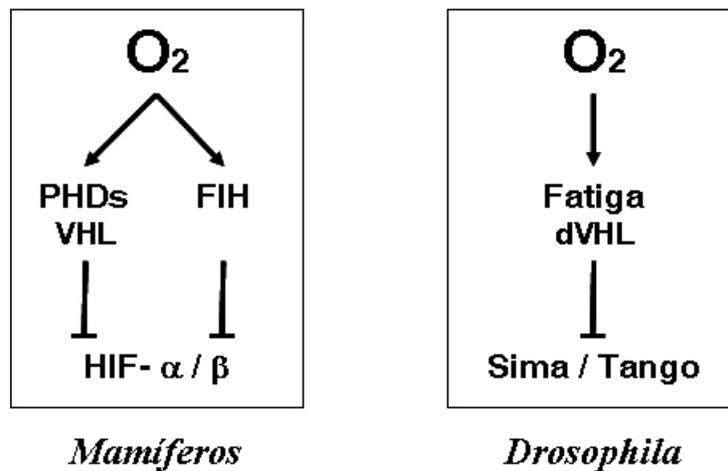


Figura 6. *Drosophila* contiene un sistema homólogo a HIF de mamíferos, constituido por un heterodímero de proteínas bHLH-PAS, Sima y Tango. La subunidad α , Sima está regulada por niveles de oxígeno a nivel de estabilidad de la proteína y de localización subcelular. Se desconoce si existe regulación de la actividad transcripcional de Sima. La subunidad β , Tango, es una “pareja” común de otras proteínas bHLH-PAS de *Drosophila* y no posee una regulación obvia por niveles de oxígeno. Se identificaron los homólogos de las proteínas involucradas en la regulación de la estabilidad de HIF, siendo Fatiga el homólogo de las PHDs y dVHL el homólogo de VHL.

3.2.2- Actividad transcripcional de Sima

Para estudiar la respuesta transcripcional a hipoxia en *Drosophila* se construyeron reporteros transcripcionales conteniendo un fragmento de 233pb del promotor de la lactato deshidrogenasa murina (LDH – gen regulado positivamente en hipoxia) clonado río arriba del gen reportero Lac-Z (HRE-LacZ) (Lavista-Llanos y col., 2002) (figura 7A). Utilizando líneas de moscas transgénicas que contenían este reportero transcripcional se demostró que Sima y Tango median la respuesta a hipoxia en *Drosophila* y que dicha respuesta está fuertemente modulada por parámetros del desarrollo, mostrando máxima expresión en estadios tardíos del desarrollo embrionario (Centanin y col., 2005; Lavista-Llanos y col., 2002). Se utilizó además un reportero transcripcional en células S2 generado a partir de un fragmento dimerizado de 51 pb proveniente del promotor de la lactato deshidrogenasa (región mínima necesaria para su inducción en hipoxia), clonada río arriba del gen de la luciferasa (Dekanty y col., 2005) (figura 7B). Se demostró que las células S2 también son capaces de responder a hipoxia y que en este contexto la respuesta depende de Sima y Tango (Dekanty y col., 2005). Esta herramienta permitió llevar a cabo estudios exhaustivos de la respuesta a hipoxia en células S2 permitiendo combinar diferentes tratamientos farmacológicos con el silenciamiento sistemático de genes candidatos a regular la respuesta a hipoxia (Dekanty y col., 2005).

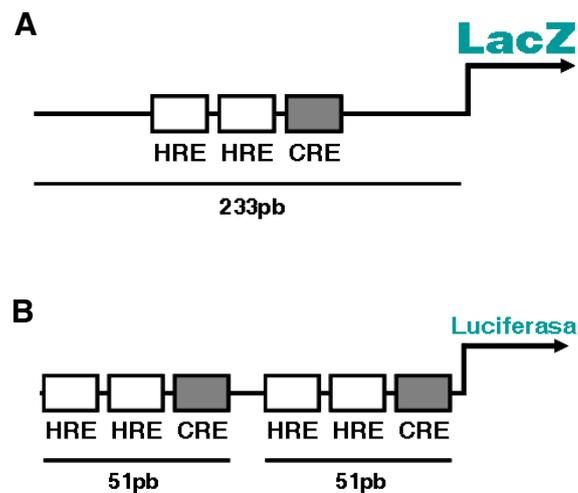


Figura 7. Reporteros Transcripcionales de Sima. A) Reportero transcripcional utilizado para generar líneas de moscas transgénicas. Un fragmento de 233 pb del *enhancer* del gen LDH murino fue clonado río arriba de LacZ. La secuencia incluye dos elementos HRE y un sitio CRE; los tres sitios son necesarios para la inducción en hipoxia del gen LDH de mamíferos. B) Reportero transcripcional utilizado en células S2. El reportero contiene la mínima región del gen de LDH que incluye los dos sitios HRE y el sitio CRE (51pb). Esta secuencia está dimerizada y clonada río arriba del gen de la luciferasa.

En *Drosophila*, no se ha identificado un homólogo de FIH y no hay indicios de la existencia de una posible asparagina involucrada en la regulación dependiente de oxígeno del reclutamiento de co-activadores transcripcionales.

3.2.3- Localización Subcelular de Sima

Experimentos llevados a cabo en embriones transgénicos que sobre-expresan Sima revelaron que la localización subcelular de esta proteína también depende de la tensión del oxígeno (Lavista-Llanos y col., 2002). En estos estudios la sobreexpresión de Sima logró contrarrestar la rápida degradación de la proteína, pudiéndose analizar la regulación de la localización subcelular dependiente de oxígeno. En este paradigma experimental, Sima es principalmente citoplásmica en normoxia y mayormente nuclear en condiciones de hipoxia (Lavista-Llanos y col., 2002), de manera similar a lo previamente descrito para HIF-1 α (Fig. 8). Es relevante destacar que esta regulación no ocurre de un modo a “todo o nada”, sino que se comporta como una respuesta dosis-dependiente en la cual niveles de oxígeno progresivamente menores provocan que la proteína sea progresivamente más nuclear (Dekanty y col., 2005).

Interesantemente, la localización subcelular de Sima está modulada además por parámetros del desarrollo. Por ejemplo, en embriones tempranos mantenidos en normoxia Sima se

localiza exclusivamente en el citoplasma, pero hacia el final de la embriogénesis una proporción de los embriones muestra a Sima distribuida en ambos compartimentos en normoxia e incluso existen algunos embriones en los que Sima se encuentra localizada en el núcleo (Dekanty y col., 2005). Interesante, la eliminación del ODDD torna a Sima constitutivamente nuclear, independientemente de la tensión de oxígeno (Lavista-Llanos y col., 2002). El mecanismo molecular a través del cual el oxígeno regula la localización subcelular de HIF- α o de Sima no era conocido. En esta Tesis se ha contribuido a dilucidar esta regulación utilizando principalmente el sistema de *Drosophila* (Romero y col., 2008).

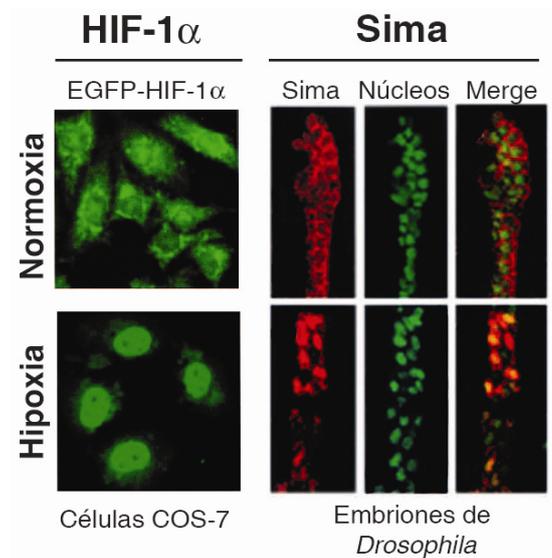


Figura 8. La localización Subcelular de Sima y de HIF-1 α está regulada por el oxígeno. HIF-1 α en células COS-7 y Sima en embriones de *Drosophila* se localizan en el citoplasma en normoxia y en el núcleo en hipoxia. (Modificado a partir de Kallio y col, 1998 y de Lavista-Llanos y col, 2002)

III- TRANSPORTE DE PROTEÍNAS ENTRE EL NÚCLEO Y EL CITOPLASMA

En células eucariotas, el compartimento para la síntesis del RNA, el núcleo, se encuentra separado de aquél donde ocurre la síntesis proteica, el citoplasma, por una doble bicapa lipídica denominada envoltura nuclear (EN). Por lo tanto, para que la célula pueda funcionar como una única entidad, las moléculas deben ser transportadas bidireccionalmente entre ambos compartimentos. Esta comunicación entre el núcleo y el citoplasma ocurre a través del denominado complejo del poro nuclear (CPN), el cual se encuentra inserto dentro de la envoltura nuclear. El transporte de proteínas y RNA a través del CPN está mediado por una superfamilia de receptores de transporte llamados Karioferinas. Las karioferinas se unen a sus proteínas cargo por el reconocimiento específico de Señales de Localización Nuclear (NLSs) o Señales de Exportación Nuclear (NESs). El transporte a través del CPN está facilitado por interacciones transientes y dinámicas entre las karioferinas y componentes específicos del CPN. La interacción de las Karioferinas con sus moléculas cargo está regulada por una GTPasa pequeña denominada Ran. Ran es a su vez modulada por proteínas que regulan su ciclo GTPasa y su localización subcelular.

1. Complejo del poro nuclear (CPN)

El CPN es una estructura proteica macromolecular que forma un canal a través de la envoltura nuclear. Está constituido por nucleoporinas (Nups) que facilitan la función de importación y exportación de proteínas y RNAs (Cronshaw y col., 2002; Dworetzky y Feldherr, 1988; Rout y col., 2000; Tran y Wentz, 2006). Existen tres clases de nucleoporinas: Las proteínas de membrana del poro (Poms), las Nups que contienen múltiples repeticiones Fenilalanina-Glicina (FG-Nups) y las Nups estructurales (Figura 9).

El primer grupo, constituido por las Poms, corresponde a las proteínas más externas del CPN y consiste en típicas proteínas de membrana que median el anclaje del poro a la bicapa lipídica (Rout y col., 2000). Las Poms contienen dominios transmembrana tipo α -hélice y tipo cadherina. Mientras que las α -hélices ayudan a anclar el CPN a la envoltura nuclear, los dominios cadherina permiten estabilizar la curvatura de la envoltura nuclear funcionando como puente entre la membrana interna y la membrana externa (Wheelock y Johnson, 2003).

El segundo grupo de nucleoporinas está conformado por las FG-Nups. Estas contienen dominios discretos que intercalan secuencias repetitivas de Fenilalanina-Glicina (FG) o Glicina-Leucina-Fenilalanina-Glicina (GLFG) o Fenilalanina-residuoX-Fenilalanina-Glicina (FxFG) con segmentos que contienen residuos polares de largo variable. Este grupo de

proteínas se encuentra en la región central del CPN y dada la incapacidad que tienen estos dominios para plegarse, las FG-Nups extienden estructuras filamentosas hacia las caras citoplasmática y nuclear de la envoltura nuclear (Rout y col., 2000). El dominio FG provee baja afinidad y alta especificidad para interactuar con los receptores involucrados en el transporte activo a través del CPN. Estas características admiten el establecimiento de interacciones transientes entre las FG-Nups y los receptores de transporte, permitiendo que dichos receptores atraviesen el CPN junto a sus cargos sin ser retenidos en él (Strawn y col., 2004). Las FG-Nups se encuentran en la superficie central del poro proveyendo una región de interacción para los receptores de transporte alrededor del centro del canal. El anclaje de las FG-Nups al enorme poro nuclear está mediado por dominios adicionales del tipo *coiled-coil* (Lupas, 1996).

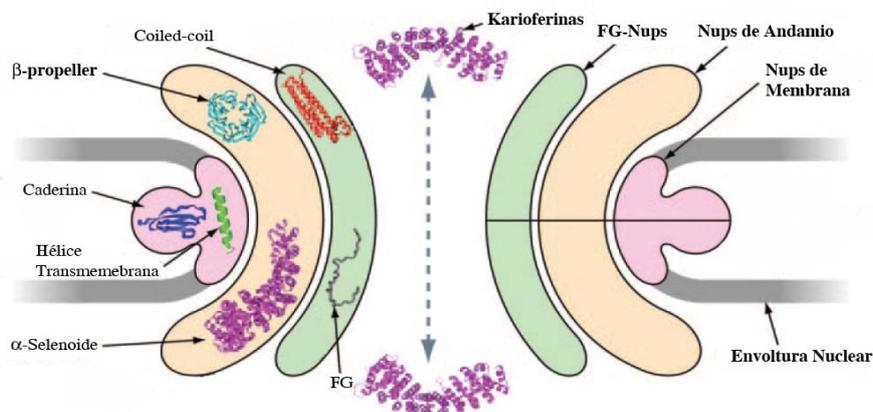


Figura 9. Esquema de la composición y arquitectura del Complejo del Poro Nuclear (CPN).

Arquitectura del anillo del CPN, vista desde el plano de la envoltura nuclear. Nótese las proteínas transmembrana, las proteínas de andamio y las proteínas FG (derecha del dibujo). Los dominios que contienen cada uno de estos tres grupos de Nups se observan en la parte izquierda del esquema. (Modificado a partir de Devos et al. 2006)

El tercer grupo, constituido por las Nups estructurales, sólo contiene proteínas con propiedades de plegamiento del tipo α -solenoides o β -propeller. Toda Nup que no contenga dominios α -hélice o motivos FG contiene al menos uno de los tipos de plegamiento que definen a las Nups estructurales. Mientras que las Nups transmembrana y las FG-Nups se ubican respectivamente en la cara externa e interna del CPN, las Nups estructurales funcionan como andamio vinculando el grupo externo con el grupo interno (Devos y col., 2006). Esto permitiría la unión entre las diferentes partes del CPN consolidando así su arquitectura general.

2. Receptores de Transporte: Las Karioferinas

La importación y exportación de la mayoría de las proteínas, de las subunidades ribosomales, y de algunos RNAs, están mediadas por una gran familia de proteínas de transporte evolutivamente conservadas, globalmente denominadas Karioferinas (Pemberton y Paschal, 2005). Dentro de la familia de las Karioferinas, se encuentran las α -karioferinas y las β -karioferinas; estas últimas, a su vez, se dividen en dos grupos determinados por la dirección en la que facilitan el transporte: 1) Las importinas que median la importación nuclear reconociendo señales de localización nuclear (NLSs) y 2) Las exportinas, involucradas en la exportación nuclear merced al reconocimiento de señales de exportación (NES) en las proteínas cargo (Fried y Kutay, 2003) (Weis, 2003). La asociación entre la karioferina y la señal de transporte nuclear puede ocurrir de manera directa o de manera indirecta, utilizando adaptadores. Uno de los adaptadores más conocidos que participa de la importación de proteínas es la importina- α , perteneciente al grupo de las α -karioferinas.

La función intrínseca de las β -karioferinas en la importación y exportación nuclear recae en la capacidad de estas proteínas de interactuar directamente, tanto con las proteínas cargo, como con las nucleoporinas y con RanGTP. Presentan tres dominios funcionales: el dominio de unión a Ran se encuentra en la porción amino-terminal; el dominio de unión a FG-nucleoporinas se localiza en la parte central de la proteína y el dominio de unión a la proteína-cargo se halla en la parte carboxi-terminal de la β -Karioferina.

Esta posibilidad de interactuar con varias proteínas a la vez tiene lugar gracias a la gran flexibilidad estructural y a la extensa superficie de interacción que presentan las Karioferinas. La β -Karioferina que ha sido mejor estudiada es la denominada importina- β , la cual incluye 20 repeticiones en tandem de un motivo denominado HEAT. El motivo HEAT está compuesto por aproximadamente 40 aminoácidos que dan lugar a dos hélices antiparalelas, designadas como hélice A y hélice B, conectadas por una pequeña horquilla (Andrade y Bork, 1995; Andrade y col., 2001). El arreglo de las repeticiones HEAT define a una súper hélice espiralada en forma de solenoide compuesta por dos arcos correspondientes a la mitad N-Terminal y a la mitad C-Terminal del receptor. Esta disposición espacial le confiere a la importina- β una gran superficie de interacción en los arcos (Figura 10). La superficie cóncava interna del espiral, formada por las hélices B, interacciona con RanGTP a través del arco N-Terminal y con el cargo o proteína adaptadora (importina- α) a través del arco C-Terminal (Cingolani y col., 1999; Chook y Blobel, 1999; Vetter y col., 1999). La superficie convexa externa está formada por las hélices A, las cuales interaccionan con los motivos FG de las nucleoporinas (Bayliss y col., 2000; Bayliss y col., 2002). Además de la inherente flexibilidad de estos solenoides, otra capacidad intrínseca de dicha estructura es facilitar el

acomodamiento de diferentes proteínas cargo por medio de un mecanismo de “encaje inducido” (Conti y col., 2006).

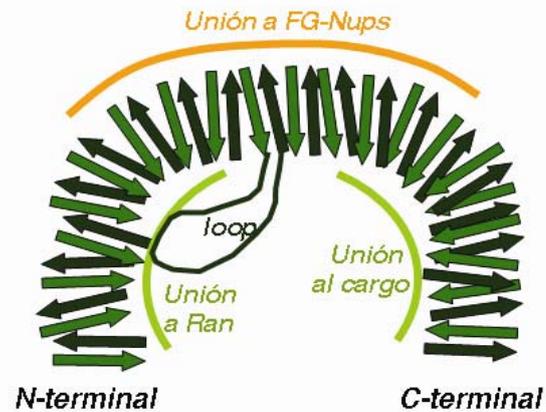


Figura 10. Esquema de la estructura espacial de la Importina- β y de sus dominios funcionales. La capacidad de las β -Karioferinas de mediar el transporte de sus proteínas-cargo se debe principalmente a su estructura flexible que le permite interactuar tanto con RanGTP como con el cargo y las FG-Nups del CPN. La súper-hélice espiralada formada por las repeticiones HEAT genera dos arcos de unión en la cara interna que media la interacción con RanGTP o con el cargo. La cara externa del solenoide participa en la unión a las FG-Nups. Nótese la presencia de un loop en la cara interna, este regula la unión excluyente con RanGTP o con el cargo (ver sección 6.1.3).

3- Ciclo Clásico de Importación Nuclear

El mecanismo de transporte entre el núcleo y el citoplasma mejor estudiado es el camino clásico de la importación nuclear que involucra el reconocimiento de una NLS por parte de una karioferina (Figura 11). Hasta el momento, se han identificado cientos de proteínas conteniendo NLSs que son importadas por un complejo heterodimérico, compuesto por importina- α e importina- β (Gorlich y col., 1995; Moroianu y col., 1995). El estudio minucioso del mecanismo de importación, entre la década del ochenta y del noventa, permitió describir un modelo detallado que consta de los siguientes pasos: 1) La importina- α unida a la importina- β reconoce la secuencia NLS del cargo en el citoplasma para dar lugar a la formación de un complejo de importación trimérico (Enenkel y col., 1995; Izaurralde y col., 1997; Kalderon y col., 1984; Kuersten y col., 2001; Macara, 2001; Robbins y col., 1991); 2) Este complejo entra en el núcleo desplazándose a través del poro nuclear, merced a las interacciones físicas entre la importina- β y las FG-Nups del CPN; 3) Una vez alcanzado el núcleo, el complejo de importación trimérico se encuentra con RanGTP; 4) La unión de la importina- β a RanGTP provoca un cambio conformacional en la importina- β que resulta en su

separación de la importina- α y del cargo; 5) La importina- α posee baja afinidad por el cargo cuando no está unida a la importina- β , por lo que la importina- α también se separa del cargo; 6) Cuando el cargo se libera, la importina- α es re-exportada al citoplasma en un proceso mediado por un receptor de exportación específico denominado CAS con quien forma un complejo trimérico que incluye a RanGTP.

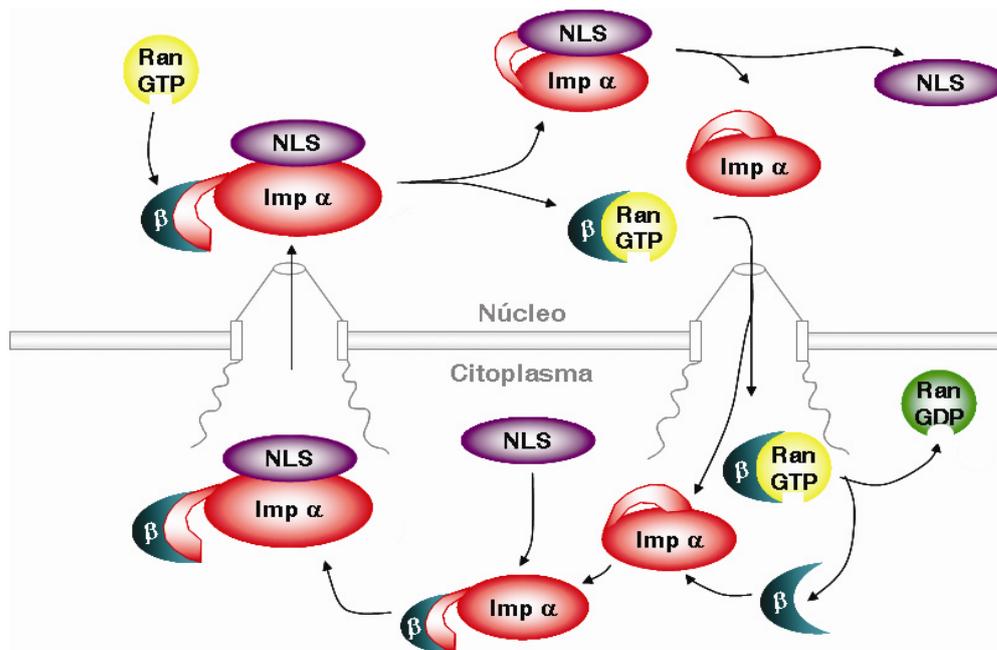


Figura 11. Ciclo de Importación Nuclear. La importina- α unida a la importina- β reconoce y une la NLS del cargo en el citoplasma y el complejo trimérico atraviesa el CPN. En el núcleo, la unión de Ran GTP a la importina- β disocia el complejo, provocando la liberación del cargo. Para completar el ciclo, la importina- α y la importina- β son re-exportadas al citoplasma de manera independiente.

3.1- Señal de localización nuclear clásica (NLS)

El primer paso en la importación nuclear consiste en el reconocimiento de la proteína cargo por parte de la importina. Las proteínas destinadas a ser importadas al núcleo contienen una secuencia característica de aminoácidos, la NLS. La señal de transporte mejor caracterizada es la NLS clásica (cNLS). Existen dos tipos de cNLSs, las cuales están caracterizadas por la presencia de uno (monopartita) o dos (bipartitas) fragmentos de aminoácidos básicos (Dingwall y Laskey, 1991; Kalderon y col., 1984; Robbins y col., 1991). Las cNLSs monopartitas están ejemplificadas por la NLS del antígeno T del virus SV40; se trata de la

secuencia ¹²⁵KKKRR¹³¹ en la que lisinas y argininas forman un único parche de aminoácidos básicos. Las cNLSs bipartitas están ejemplificadas por la NLS de la nucleoplasmina cuya secuencia es ¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰, donde una lisina y una arginina forman un primer parche de aminoácidos básicos y luego, a 10 aminoácidos de distancia, se encuentra un segundo parche de aminoácidos básicos constituido por 4 residuos de lisina.

Estudios estructurales (Conti y col., 2006; Fontes y col., 2000) y termodinámicos (Hodel y col., 2001) han permitido definir muchos de los requerimientos que una cNLS debe cumplir. Se encontró que una cNLS monopartita requiere una lisina en la posición 1 seguida de residuos básicos en las posiciones 2 y 4 (K(K/R)X(K/R)). Estudios recientes indican que la tasa de importación de una proteína cargo que contiene una cNLS depende no sólo de la capacidad de formación del complejo de importación (Riddick y Macara, 2005), sino también de la acumulación nuclear de la proteína cargo (Hodel y col., 2006). Ambas características están determinadas, al menos en parte, por la afinidad de la importina- α por la NLS. Por lo tanto, secuencias muy similares a una cNLS pueden no ser funcionales debido a que la interacción con la importina es demasiado débil, disminuyendo la eficiencia de formación del complejo ternario. Otro motivo posible para que una cNLS no sea funcional es que la interacción con la importina sea demasiado fuerte, dificultando la disociación del complejo ternario en el núcleo (Gilchrist y Rexach, 2003). Estos datos indican que una cNLS funcional debe tener una constante de afinidad intermedia con la importina, la cual debe estar en el orden nanomolar.

4- Ciclo Clásico de Exportación Nuclear

El mecanismo de exportación nuclear más ampliamente utilizado por las proteínas fue identificado una década más tarde e involucra el reconocimiento de una secuencia de exportación nuclear (NES) presente en la proteína cargo (Figura 12). La karioferina de exportación mejor caracterizada es una proteína denominada CRM1. Esta exportina interacciona con la NES en presencia de RanGTP y RanBP3 y el complejo resultante es exportado al citoplasma (Fornerod y col., 1997; Petosa y col., 2004; Stade y col., 1997). Hasta el momento sólo han sido identificadas unas 80 proteínas que contienen NESs consenso para CRM1. Notablemente, la afinidad de las NES por CRM1 es alrededor de quinientas veces menor que la afinidad de la importina- α por las NLS presentes en los sustratos de importación (Askjaer y col., 1999; Gilchrist y Rexach, 2003; Hodel y col., 2006; Paraskeva y col., 1999).

La secuencia de eventos en el proceso de exportación de proteínas dependiente de CRM1 es la siguiente: 1) CRM1 se une a RanBP3 en el núcleo generando un cambio conformacional en CRM1, el cual aumenta su afinidad por RanGTP y por la NES del cargo (Englmeier y col.,

2001; Lindsay y col., 2001) dando lugar a la formación del complejo CRM1-RanBP3-RanGTP-NES; 2) este complejo es translocado al citoplasma a través del CPN, en un proceso que involucra la interacción de CRM1 con las FG-Nups; 3) una vez que el complejo ha alcanzado el citoplasma, el GTP unido a Ran se hidroliza para dar RanGDP; 4) esta hidrólisis provoca la desestabilización del complejo y por ende, el cargo se libera en el citoplasma; 5) CRM1 se une a RanBP2 para poder ingresar nuevamente al núcleo y RanBP3 re-ingresa al núcleo junto con la importina- α 3 (Welch y col., 1999).

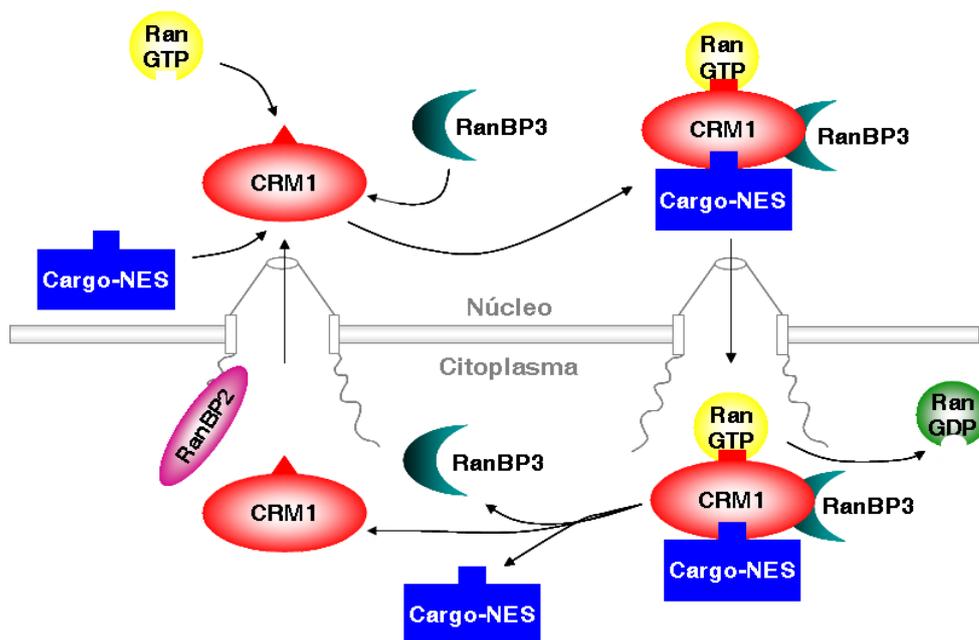


Figura 12. Ciclo de Exportación Nuclear de proteínas dependiente de CRM1. La unión de RanBP3 a CRM1 estabiliza la unión con RanGTP y con la NES del cargo. El complejo se transloca al citoplasma donde el GTP unido a Ran es hidrolizado provocando la disociación del complejo y en consecuencia, la liberación del cargo. Para cerrar el ciclo, CRM1 y RanBP3 son re-importados al núcleo.

4.1- Señal de Exportación Nuclear (NES)

Si bien, aún existe controversia sobre si CRM1 interacciona con la proteína cargo de manera directa en ausencia de RanGTP o si sólo lo hace en presencia de RanGTP, existe un consenso general de que la unión de CRM1 con la proteína cargo y RanGTP es cooperativa. Para que dicha unión ocurra, el cargo debe contener una secuencia consenso de exportación nuclear (NES). Las primeras NESs fueron identificadas en 1995 y correspondieron al inhibidor de la proteín-Kinasa A (LALKLAGLDI) (Wen y col., 1995) y a la proteína viral HIV Rev

(LQLPPLERLTL) (Fischer y col., 1995). Si bien ambas NES se caracterizaban por una alta proporción de residuos hidrofóbicos, no resultaba obvio cómo predecir la existencia de una NES. Hacia el año 2003 ya se habían descrito 58 proteínas que contenían NES y en consecuencia, se pudo inferir un posible consenso que las define: La NES involucra una secuencia de 10 aminoácidos, donde cuatro de ellos son hidrofóbicos y están separados entre sí por un número definido de residuos: **L-X(2-3)-[LIVFM]-X(2-3)-L-X-[LI]** (Fig. 13) (la Cour y col., 2003). Es importante destacar que sólo el 38% de las NES descritas se ajusta de manera exacta a este consenso y nótese que ninguna de las dos NESs identificadas inicialmente respetan este consenso de manera total. La falta de una secuencia consenso estricta que defina a las NES dificulta la utilización de algoritmos para su predicción, haciendo difícil la identificación de señales funcionales.

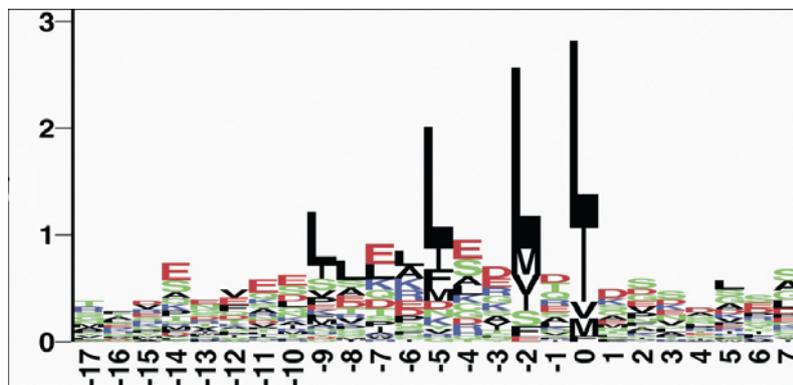


Figura 13. Alineamiento de 58 NES simbolizadas como secuencias Logo: los caracteres que representan la secuencia se apilan uno encima de otro para cada posición. La altura de cada letra es proporcional a su frecuencia; las letras están ordenadas de modo tal que las más representadas están en la parte superior y las menos representadas en la parte inferior (Schneider y Stephens, 1990); Modificado de La Cour et al, 2003).

Estudios estructurales (la Cour y col., 2004) y termodinámicos (Engelsma y col., 2004; Kutay y Guttinger, 2005) de las NESs han permitido definir algunas propiedades adicionales que las caracterizan. La NES reside en una superficie expuesta, usualmente una α -hélice ubicada dentro de una región altamente flexible de la proteína. Las estructuras secundarias predichas de las NESs caracterizadas hasta el momento sugieren que aproximadamente el 70% de las NESs adoptarían una estructura de α -hélice en la parte N-terminal de la señal. La NES se encontraría cercana a una transición (por ejemplo un *loop*) con un segundo elemento estructural que en la mayoría de los casos es una segunda α -hélice (la Cour y col., 2004). Asimismo, los residuos hidrofóbicos que definen las NESs protruyen tres de ellos hacia un

mismo lado de la hélice, mientras que el cuarto residuo mira hacia el lado opuesto de la hélice (Rittinger y col., 1999).

Por otro lado, estudios termodinámicos indican que, al igual que en el caso de las NLSs, la tasa de exportación de la proteína cargo que contiene una NES depende, no sólo de su capacidad para formar el complejo de exportación, sino también de la facilidad con la que dicho complejo se disocia en el citoplasma (Engelsma y col., 2004; Kutay y Guttinger, 2005). Por lo tanto, puede ocurrir que secuencias NES tengan escasa actividad debido a una interacción demasiado débil con CRM1, dificultándose la formación del complejo o alternativamente, a una interacción demasiado fuerte con CRM1 que impediría la disociación del complejo CRM1-Cargo-RanGTP-RanBP3 en el citoplasma (Engelsma y col., 2004; Kutay y Guttinger, 2005). En consecuencia, las NESs han evolucionado para tener una afinidad por CRM1 relativamente baja, de modo que el complejo de exportación pueda desensamblarse eficientemente.

5- Direccionalidad del transporte de proteínas y RanGTP

Ran, un miembro de la familia de las GTPasas pequeñas, es un componente esencial para la importación y exportación nuclear a través del CPN (Gorlich y Mattaj, 1996; Nigg, 1997). Ran existe en 2 conformaciones según esté unido al nucleótido trifosfato o al nucleótido bifosfato: RanGTP o RanGDP. Ambas formas exhiben una distribución asimétrica a cada lado de la envoltura nuclear, con altos niveles en el núcleo de RanGTP (y bajos en el citoplasma) (Tachibana y col., 1994) y altos niveles en el citoplasma de RanGDP (y bajos en el núcleo) (Izaurrealde y col., 1997). La preponderancia de RanGTP en el núcleo y no en el citoplasma se debe a la distribución asimétrica de los reguladores de la hidrólisis del GTP y de los intercambiadores de GDP por GTP (ver más abajo) (Figura 14).

5.1- El ciclo de RanGTP

El ciclo de Ran está regulado por la distribución núcleo-citoplasmática de varias proteínas regulatorias que interactúan con ella o modulan su actividad (Fig. 14). Una de estas proteínas es un intercambiador de GDP por GTP (RanGEF) llamada RCC1, la cual es exclusivamente nuclear y está asociada a la cromatina (Nemergut y col., 2001; Seki y col., 1996). RCC1 facilita la disociación del GDP de Ran y permite la unión del GTP, ocasionando un aumento de los niveles de RanGTP en el núcleo. Por otra parte, una serie de proteínas regulatorias que están enriquecidas en el citoplasma, promueven la hidrólisis de RanGTP generando un aumento de RanGDP en el citoplasma. Una de estas proteínas citoplasmáticas, RanGAP (Ran GTPase-Activating Protein), potencia la actividad GTPasa

intrínseca de Ran, acelerando la conversión de RanGTP a RanGDP (Bischoff y col., 1994). Dos proteínas accesorias, RanBP1 y RanBP2 estimulan la actividad de RanGAP interaccionando previamente con RanGTP (Melchior y Gerace, 1998). RanBP1 es exclusivamente citoplasmática y RanBP2 se localiza en la cara citoplasmática del CPN, asociada a los filamentos citoplasmáticos del poro (Izaurre y col., 1997; Yokoyama y col., 1995). Además, RanGAP1 sumoilada se asocia a RanBP2, aumentando su concentración en la periferia citoplasmática del CPN (Mahajan y col., 1997). De esta manera, debido a la localización asimétrica de las proteínas mencionadas, la conversión de RanGDP a RanGTP ocurre exclusivamente en el núcleo, mientras que la hidrólisis del GTP para dar lugar a RanGDP ocurre en el citoplasma.

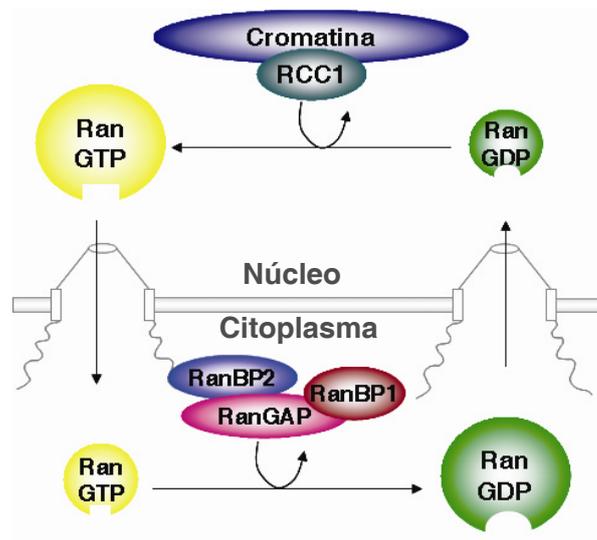


Figura 14. La abundancia relativa de RanGTP y RanGDP en cada uno de los compartimentos está determinada por una distribución asimétrica de proteínas regulatorias. Rcc1 (RanGEF) unido a la cromatina disocia el GDP de Ran, permitiendo la unión del GTP. Una vez que RanGTP es translocado al citoplasma junto con el cargo y los demás componentes del complejo, RanBP1 y RanBP2 cooperan con RanGAP (Ran GTPase activating protein) para inducir la hidrólisis del GTP para dar RanGDP. Esto resulta en bajos niveles de RanGTP en el citoplasma.

5.2- Interpretación del gradiente de Ran

La interacción de RanGTP con las karioferinas afecta su unión al cargo de manera tal de imponer direccionalidad al transporte a través del CPN. Las importinas unen la proteína cargo en el citoplasma, como se detalló anteriormente, y la conducen a través del CPN. Cuando el

complejo llega al núcleo, se encuentra con RanGTP el cual se une a la importina induciendo la liberación del cargo. El complejo importina-RanGTP es exportado del núcleo y, una vez en el citoplasma, RanGAP junto a RanBP1 y RanBP2 contribuyen a que RanGTP se hidrolice liberando la importina.

El ciclo de exportación está regulado de manera similar; la diferencia en este caso radica en que RanGTP promueve la unión de la exportina al cargo en lugar de la liberación del cargo como se mencionó mas arriba para el caso de las importinas. Una vez que el complejo cargo-exportina-RanGTP atraviesa el CPN y llega al citoplasma, se produce la hidrólisis de RanGTP, induciendo su liberación del complejo. La liberación de Ran reduce la afinidad de la exportina por el cargo resultando en la liberación del cargo, en el citoplasma y permitiendo que la exportina vacía sea re-importada al núcleo.

De esta manera, las importinas y exportinas actuarían como sensores de RanGTP (Kuersten y col., 2001) regulando la disociación o asociación al cargo.

6- La unión de las Karioferinas a sus proteínas cargo

Un paso crucial tanto en el mecanismo de importación como en el mecanismo de exportación está dado por la capacidad de la karioferina de unirse y disociarse del cargo en el compartimento adecuado. Tanto el ensamblaje como el desensamblaje de los complejos de transporte dependen de que la importina- α , en el caso de la importación, o CRM1, en el caso de la exportación, adopten dos conformaciones alternativas que habiliten o desfavorezcan su interacción con Ran. Estas propiedades de las karioferinas de adoptar dos conformaciones alternativas que condicionan su interacción con el cargo son abordadas en mayor detalle a continuación.

6.1- Importina- α

6.1.1- Reconocimiento y unión a la cNLS

Las bases estructurales del reconocimiento de una cNLS por parte de la importina- α se han definido por cristalografía de rayos X (Conti y Kuriyan, 2000; Conti y col., 1998; Fontes y col., 2003; Fontes y col., 2000). Estos estudios revelaron que la importina- α se compone de: i) Un gran dominio curvilíneo, ARM, constituido por diez motivos de armadillo, cada uno de ellos formados por tres α -hélices (Figura 15 A) ii) y un dominio N-terminal flexible (IBB) necesario para la unión a importina- β (Gorlich y col., 1995) y la disociación del cargo (Fanara y col., 2000; Harreman y col., 2003; Kobe, 1999). Las repeticiones de armadillo generan una suave curvatura en el dominio ARM formando una cara cóncava donde se

encuentran dos bolsillos o sitios de unión a las cNLS (Conti y col., 1998; Kobe, 1999). El bolsillo principal, ubicado cerca de la región N-terminal del dominio ARM, une secuencias cNLSs monopartitas y, en caso de las cNLSs bipartitas, sólo une la porción básica más grande (la C-terminal). El segundo bolsillo se encuentra hacia la región C-terminal del dominio ARM y une el fragmento más pequeño de residuos básicos de las cNLSs bipartitas. Las cNLSs unidas a estos dos bolsillos adoptan una conformación extendida con sus cadenas principales orientadas de manera antiparalela al sentido de las cadenas de la importina- α .

El dominio IBB o autoinhibitorio N-terminal contiene la secuencia de aminoácidos KRR que simula una cNLS. Debido a su alta flexibilidad, esta región puede extenderse hasta los bolsillos de unión a las NLSs, generando competencia con el cargo por sus propios sitios de unión (Conti y col., 1998; Kobe, 1999).

6.1.2- Regulación de la interacción entre la importina- α y la cNLS

La disociación del complejo trimérico de importación, formado por la importina- α , la importina- β y el cargo, es crítica para el adecuado transporte de proteínas al núcleo. RanGTP induce la disociación de la importina- β del resto de los componentes del complejo (Lee y col., 2005). La separación de la importina- β conduce a la liberación del dominio N-terminal de la importina- α y este dominio inhibitorio, una vez liberado, compete por la unión con la NLS de la proteína cargo (Harreman y col., 2003). En forma paralela, la disociación del complejo trimérico inducida por RanGTP desencadena un profundo cambio conformacional en la importina- α , haciendo que ésta pase de una conformación abierta ávida por la cNLSs a una conformación cerrada y estable que no permite la interacción con el cargo. Esto es posible, no sólo debido a la existencia del gradiente de Ran, sino también por la gran flexibilidad estructural de las karioferinas (Fig. 15B).

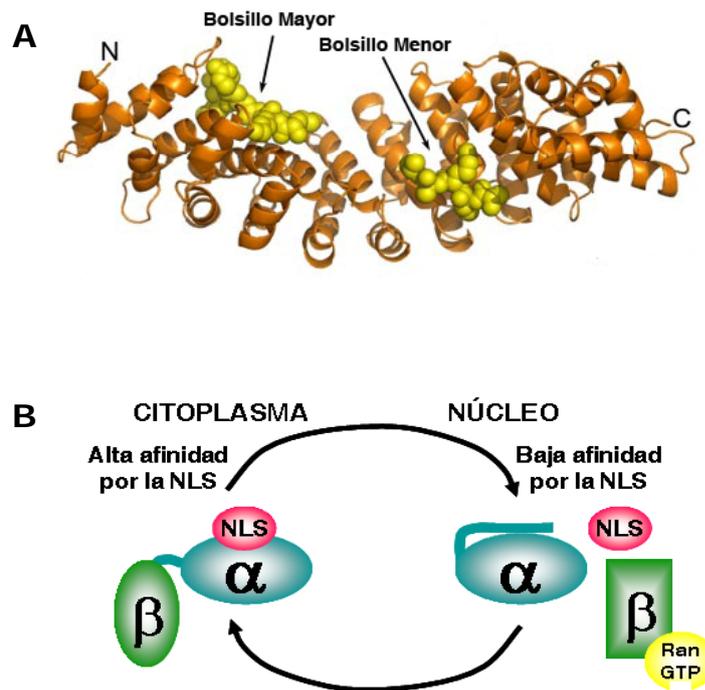


Figura 15. Importina- α . A) Estructura del dominio ARM de la importina- α ; se indican los dos bolsillos de unión a las NLSs. B) Regulación de la unión de la importina- α a la cNLS: En el citoplasma, la importina- β interacciona con el dominio autoinhibitorio de la importina- α , permitiendo que la cNLS se una al dominio ARM con alta afinidad. Una vez en el núcleo, RanGTP se une a la importina- β , provocando un cambio conformacional que deja libre el dominio autoinhibitorio. Este dominio compete con la cNLS por el sitio de unión en la importina- α desplazando al cargo del complejo. Esta competencia contribuye a la baja afinidad de las cNLSs por la importina- α en el compartimento nuclear, lo cual es esencial para la liberación del cargo en el núcleo.

6.1.3- Regulación de la interacción de la importina- β con la importina- α

Como se mencionó más arriba, RanGTP provoca la disociación en el núcleo de la importina- β del resto del complejo de importación. La importina- β , además de tener dominios de unión al cargo y a RanGTP en la cara interna del solenoide, posee un horquilla o *loop* ácido separando dichos dominios. Este *loop* ácido participa en la disociación inducida por RanGTP de la interacción entre la importina- α y la importina- β (Chook y col., 2002). Cuando RanGTP se une al arco N-terminal de la importina- β , el *loop* ácido, cambia su conformación y desplaza a la importina- α de su sitio de unión en la región C-terminal (Figura 10 - 17).

6.2- CRM1

6.2.1- Reconocimiento y unión a la NES

El estudio de la estructura de CRM1 posibilitó una comprensión mucho más detallada del proceso de exportación nuclear de proteínas (Petosa y col., 2004). CRM1, al igual que la importina- β , incluye 19 repeticiones HEAT que generan una súper hélice cerrada en forma de anillo, donde la primera repetición HEAT se encontraría en la vecindad de las últimas repeticiones. Las repeticiones HEAT establecen cuatro bases estructurales importantes para la formación del complejo de exportación (Figura 16): i) El sitio de unión a RanGTP (dentro de las tres primeras repeticiones HEAT). ii) El sitio de reconocimiento y unión de la NES (entre las repeticiones diez y once). iii) Un *loop* ácido llamativamente largo involucrado en la regulación de la unión a Ran y a la NES (entre las hélices A y B del HEAT 8). iv) El sitio de unión a RanBP3 (en el HEAT 9).

En CRM1 se han identificado al menos dos residuos críticos para la interacción directa con la NES (L525 y F572) que están localizados en la hélice A de las repeticiones 10 y 11 y un tercer residuo, Lys568, que permitiría, gracias a su flexibilidad, que las NES se acomoden dentro de CRM1 a pesar de su espaciamiento variable (Petosa y col., 2004).

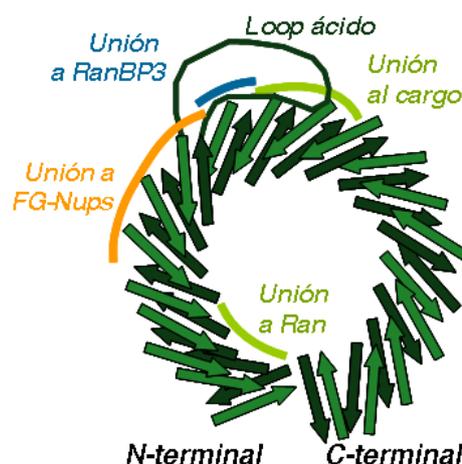


Figura 16. Esquema de la estructura de CRM1 y de sus sitios de unión a diferentes proteínas del complejo de exportación. CRM1 incluye 19 repeticiones HEAT que conforman una súper hélice cerrada. Esta conformación sería responsable de la baja afinidad de RanGTP por CRM1 debido a la inaccesibilidad de su sitio de unión. La unión del cargo se ve imposibilitada en ausencia de RanGTP debido a la presencia del *loop* ácido en el HEAT 8. La unión de RanBP3 estabiliza la unión de CRM1 a la NES del cargo y a RanGTP.

Sin embargo, es sabido que las NESs tienen afinidad muy baja o nula por CRM1 en ausencia de RanGTP; esto se debe a que en dichas condiciones, el *loop* ácido enmascara el sitio de unión a las NES. Asimismo, el *loop* ácido es capaz de unirse a los residuos básicos de RanGTP presentes en la región N-terminal. La unión de RanGTP a CRM1 genera un cambio

conformacional en el *loop* ácido, el cual deja libre el sitio de interacción con las NESs. No obstante, cabe destacarse que la unión entre RanGTP y CRM1 no se estabiliza hasta que RanBP3 interacciona con el HEAT 9, consolidando a CRM1 en una conformación favorable para la interacción simultánea con RanGTP y la NES. Este modelo cooperativo para la unión de CRM1 a los demás componentes del complejo de exportación guarda similitudes con el proceso de disociación de la interacción importina- β -carga mediada por RanGTP (Figura 17). Tanto en el caso de importina- β , como en el de CRM1, el *loop* ácido adopta dos conformaciones alternativas según esté o no esté unido a RanGTP. En este sentido, las consecuencias que tiene el cambio conformacional del *loop* en ambos receptores son opuestas. En el caso de CRM1, la unión a RanGTP tiene efecto cooperativo, desenmascarando los residuos que deben interactuar con la NES. En cambio, en el caso de la importina- β , la transición conformacional inducida por RanGTP, es excluyente ya que provoca que el *loop* desplace al cargo, favoreciendo de este modo la disociación del complejo.

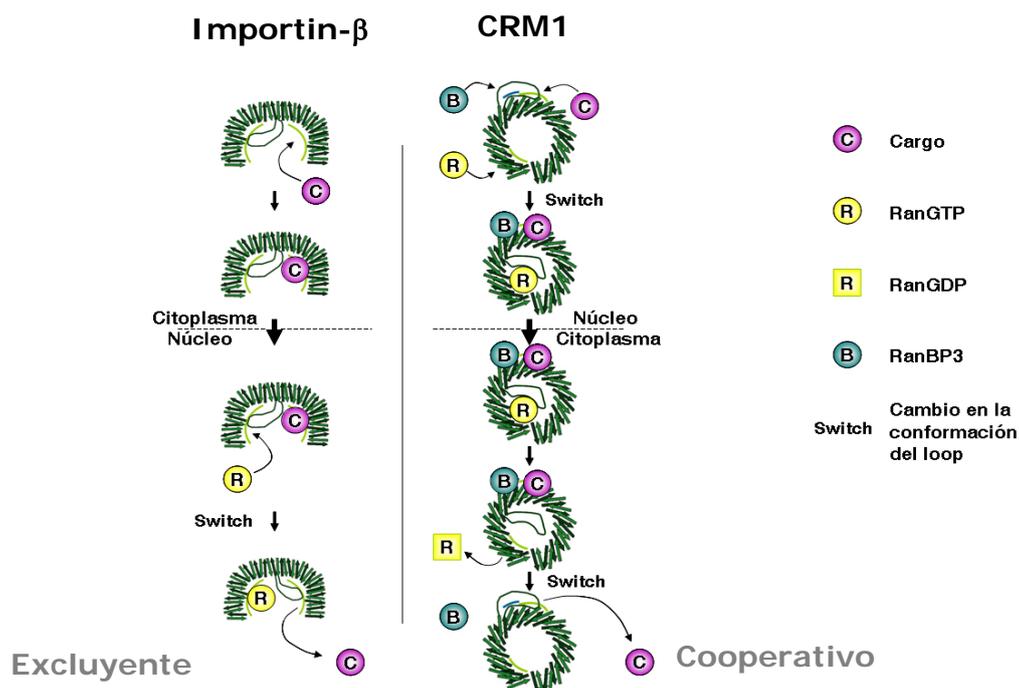


Figura 17. Comparación del modelo excluyente (Importina- β) y cooperativo (CRM1) de transición conformacional de las karioferinas. La unión de RanGTP a la porción N-terminal de la karioferina provoca un cambio conformacional en el *loop* ácido que promueve la liberación (importina- β) o la unión (CRM1) del cargo.

6.2.2- Regulación de la interacción entre CRM1 y la NES

El paso limitante del mecanismo de exportación es la formación del complejo de exportación. Esto se debe a la baja afinidad de CRM1 por las NES, aún en presencia de RanGTP (Kehlenbach y col., 2001). RanBP3 contribuye al transporte mediado por CRM1, promoviendo la formación del complejo a través de dos mecanismos independientes: Primero, RanBP3 vincula a CRM1 con RCC1 (RanGEF), el cual media el intercambio de GDP por GTP en el núcleo. Segundo, la unión de RanBP3 a CRM1 incrementa su afinidad por la NES.

Otro paso crítico en el ciclo de exportación es la disociación del complejo CRM1-NEScargo-RanGTP-RanBP3. Si bien esta disociación depende de la hidrólisis del GTP de Ran, también estarían involucradas al menos tres proteínas adicionales. El mecanismo es aún controversial, existiendo al menos dos modelos que explicarían el proceso de disociación: i) La hidrólisis de RanGTP a RanGDP por la acción de RanGAP y RanBP1 lleva directamente al desensamblaje del complejo de exportación y a la liberación del cargo en el citoplasma. ii) El complejo de exportación se asocia a Nup214-Nup88 (las cuales se encuentran en la cara citoplasmática del poro, al igual que RanBP2). La interacción estaría mediada por un sitio de unión directo de CRM1 a Nup214. La flexibilidad de los filamentos de RanBP2 hace que RanGAP asociada a RanBP2 inicie la hidrólisis del GTP unido a Ran. El cargo conteniendo la NES es liberado en el citoplasma y CRM1 interacciona de manera directa con RanBP2 facilitando su reingreso al núcleo.

6.2.3- Efectos inhibitorios de la Leptomicina B (LMB) sobre CRM1

LMB fue descubierta originalmente mediante una búsqueda de antimicóticos y antibióticos en *Streptomyces*, encontrándose que esta droga funcionaba como inhibidor específico de CRM1 (Yashiroda y Yoshida, 2003). LMB es un ácido graso insaturado (figura 18) que se une covalentemente a CRM1 a través de una cisteína que se encuentra en el dominio de reconocimiento de la NES, produciendo la inhibición específica de la unión de la NES por impedimento estérico. Por lo tanto, la acumulación nuclear de una proteína después del tratamiento con LMB es considerada una fuerte evidencia de que la proteína se exporta del núcleo de manera dependiente de CRM1. LMB es una droga potente ya que concentraciones nanomolares son suficientes para producir la acumulación nuclear de muchas proteínas después de cortos tiempos de exposición. Durante exposiciones prolongadas a la droga pueden observarse efectos colaterales que incluyen inducción de la apoptosis y arresto del ciclo celular, posiblemente debido a la acumulación nuclear de proteínas proapoptóticas o reguladores negativos del ciclo celular (Hutten y Kehlenbach, 2007).

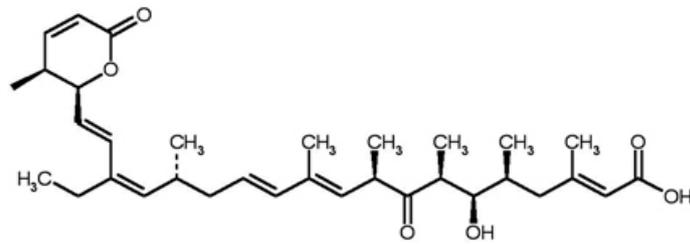


Figura 18: Estructura de la Leptomicina B (LMB): La LMB es un ácido graso insaturado con un anillo terminal de lactona. La molécula se une a una cisteína de CRM1 que se encuentra en la proximidad de los aminoácidos que participan de la unión a la NES, interfiriendo, por impedimento estérico, con el acceso a la NES.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es investigar los mecanismos que controlan la localización subcelular de Sima y el rol de esta regulación en la respuesta transcripcional a hipoxia.

Objetivos Específicos

- 1- Analizar la regulación de la localización subcelular de Sima
 - 1.1- Identificar la exportina responsable de la exportación de Sima y las NESs funcionales en la secuencia de la proteína.
 - 1.2- Determinar la importancia de la heterodimerización en la regulación de la exportación de Sima.

- 2- Determinar la importancia de la localización subcelular de Sima en la regulación de la respuesta a hipoxia.

- 3- Determinar la posible existencia de mecanismos de exportación similares en otras proteínas bHLH-PAS

RESULTADOS

I- REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE SIMA

1- Sima se mueve continuamente entre el núcleo y el citoplasma

La localización subcelular de una proteína es crucial para su función. Mientras que algunas proteínas se localizan permanentemente en el núcleo o en el citoplasma, otras son permanentemente importadas y exportadas del núcleo debido a la presencia de señales de localización o de exportación nuclear. Se ha descrito previamente que la localización de Sima en embriones (Lavista-Llanos y col., 2002), al igual que la de HIF (Kallio y col., 1998), está regulada por los niveles de oxígeno. HIF α /Sima se localiza en el núcleo en hipoxia y en el citoplasma en normoxia. Inicialmente, se postuló que HIF tendría regulada su entrada al núcleo (Kallio y col., 1998), pero sin embargo, esto fue propuesto antes de que se observara que el movimiento continuo entre el núcleo y el citoplasma (*shuttling*) es utilizado por una amplia variedad de proteínas (Ayers y col., 2007; Campana y col., 2003; Ikuta y col., 2000; Kallstrom y col., 2005; Liu y col., 2004; O'Keefe y col., 2003; Oberkovitz y col., 2007; Perander y col., 2001; Wang y col., 2006; Xiao y col., 2001; Yagisawa, 2006; Zhao y col., 2004).

Con el objeto de analizar el mecanismo dependiente de oxígeno que media la regulación de la localización subcelular de Sima, nos propusimos inicialmente responder si Sima se localiza permanentemente en el citoplasma en normoxia o si por el contrario, se mueve activamente entre ambos compartimentos con una velocidad de exportación superior a la de importación. Una posibilidad para diferenciar estas dos situaciones es alterar o bloquear la posible exportación de la proteína. Esto provocaría un cambio en el equilibrio de la localización subcelular de Sima, sólo en el caso de que la proteína oscile de forma continua entre ambos compartimentos. ¿De qué manera podemos inhibir la posible exportación de Sima? El principal exportador de proteínas de las células eucariotas es la exportina CRM1. Como se discutió detalladamente en la introducción, esta exportina interacciona con la proteína cargo formando, junto a otras proteínas, un complejo de exportación ternario que atraviesa el poro nuclear. La Leptomicina B (LMB) impide la formación de este complejo ternario, inhibiendo la exportación dependiente de CRM1 de la proteína cargo. Con el uso de esta droga no sólo se puede responder la pregunta que nos hemos planteado, sino también determinar, en el caso de que efectivamente la proteína se exporte, si CRM1 es la exportina responsable de la exportación nuclear de Sima.

Para llevar a cabo estos experimentos, utilizamos un sistema de células en cultivo transfectadas con plásmidos que median la expresión inducible de Sima por agregado de cobre (pMT - promotor de metaloteoneína), permitiendo regular temporalmente los niveles de expresión de la proteína. Sima fue fusionada a EGFP en su extremo amino terminal con el fin de poder visualizar su localización subcelular de manera dinámica. Las células S2 transfectadas fueron expuestas a distintas concentraciones de oxígeno (21, 3 y 1%) y se monitoreó la localización subcelular de las construcciones.

Como se observa en la figura 19, EGFP-Sima se localizó preferentemente en el citoplasma en normoxia (21% O₂), mientras que a 3% o 1% de oxígeno, se observó acumulación de la proteína en el compartimento nuclear. Analizamos además el efecto de la Desferroxiamina (DFO), un agente quelante de hierro que simula la hipoxia, observándose efectos similares a los descritos tras exponer las células a hipoxia (no se muestra). Este comportamiento coincide con resultados previos del laboratorio obtenidos en embriones transgénicos (Dekanty y col., 2005; Lavista-Llanos y col., 2002), indicando que el sistema de células S2 es adecuado para el análisis de la localización subcelular de Sima.

A continuación, estudiamos si la localización subcelular de Sima se altera tras el agregado de LMB. Para ello transfectamos EGFP-Sima en las células S2 y luego de inducir la expresión de la quimera durante seis horas con cobre, analizamos su localización subcelular en ausencia o en presencia de la droga. Como se muestra en la figura 19, el agregado de LMB provocó un cambio en la localización de EGFP-Sima, la cual en el control fue mayoritariamente citoplasmática y tras el agregado de LMB se tornó preponderantemente nuclear.

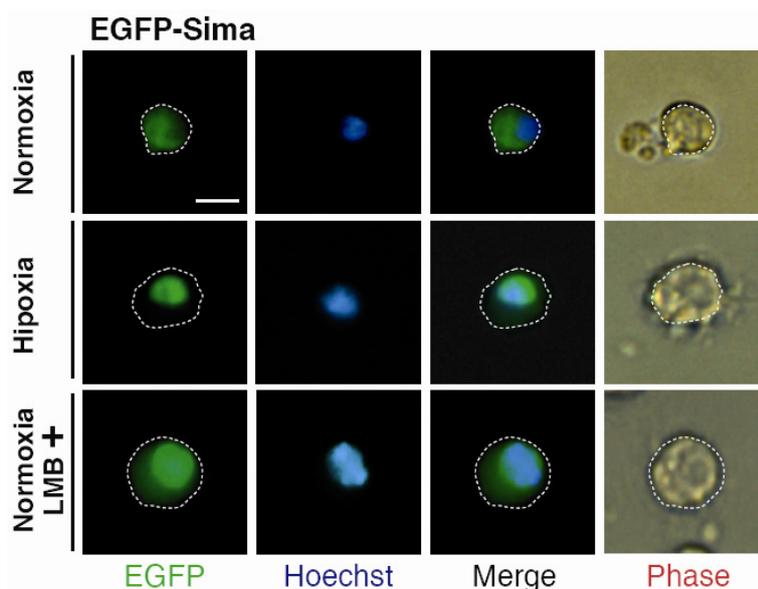


Figura 19: La localización subcelular de Sima es sensible a Leptomicina B (LMB). La proteína de fusión EGFP-Sima se transfectó en células S2 y se analizó la localización subcelular por microscopía de fluorescencia en normoxia (21% O₂), en hipoxia (3% O₂) o en normoxia 2 horas después del agregado de LMB (barra de escala: 10µm).

La localización subcelular, tanto de Sima en las células S2, como de HIF1 α de mamíferos en varias líneas celulares (Kallio y col., 1998), no se regula de manera “a todo o nada”, sino que presenta una distribución gradual. Por dicho motivo, decidimos cuantificar los resultados obtenidos, para lo cual definimos tres categorías de células según la localización subcelular de Sima: “Citoplásmica”, “nuclear” y “ubícua” (Figura 20A) (Romero y col., 2008).

Como se muestra en la figura 20B, la proporción de células con localización “nuclear” de EGFP-Sima se triplica en hipoxia (1%O₂) con respecto a normoxia (21%). Tanto LMB como DFO agregados a células mantenidas en normoxia provocan efectos similares a los observados tras la exposición de las células a hipoxia (Fig. 20B). Estas diferencias resultaron ser significativas según el test de Chi cuadrado, utilizando un N mayor a 300 para cada condición.

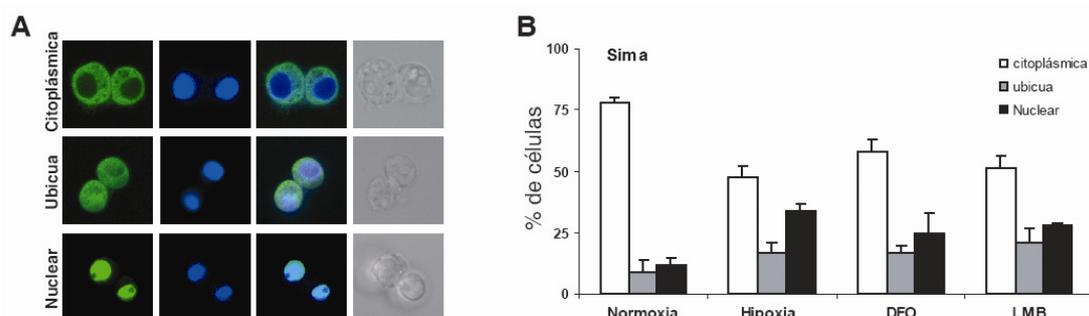


Figura 20: La localización subcelular de Sima en células S2 es sensible a Leptomicina B (LMB). A) Se definieron tres categorías de células, según la localización de EGFP-Sima: “citoplásmica”, “ubícua” y “nuclear”. B) La localización subcelular fue analizada por microscopía de fluorescencia en normoxia (21% O₂), en hipoxia (1% O₂) o en normoxia luego del agregado de DFO durante 6 horas o de LMB durante 2 horas. Se analizaron al menos 300 células para cada condición.

Estos resultados nos permiten inferir que Sima se mueve continuamente entre el núcleo y el citoplasma y que la exportación nuclear depende al menos en parte de CRM1.

2- La región N-terminal de Sima es necesaria para su localización citoplásmica.

Con el fin de identificar qué regiones de la proteína son necesarias para que Sima sea exportada al citoplasma, dividimos a la proteína en dos porciones: una amino-terminal (aminoácidos 1 a 422) y otra carboxilo-terminal (aminoácidos 692 a 1505), las cuales fueron fusionadas a EGFP dando lugar a dos construcciones EGFP-SimaN y EGFP-SimaC. Estas construcciones fueron transfectadas en células S2 y luego de veinte horas de expresión, se

analizó la localización subcelular de la quimera en presencia o ausencia de LMB. Como se muestra en la figura 21A, EGFP-SimaN se localizó en el citoplasma y resultó insensible a LMB; esto se debe a que en esta región, no está incluida la Señal de localización Nuclear (NLS), la cual mapea entre los aminoácidos 1210 y 1229 de Sima (descrita posteriormente por M. Irisarri; Tesis doctoral, 2007 y (Romero y col., 2008)). Por otro lado, EGFP-SimaC (fig. 21B) presentó un patrón de localización exclusivamente nuclear y también fue insensible a LMB. Este resultado pone de manifiesto que en la región N-terminal de la proteína, hay una o más Señales de Exportación Nuclear (NESs) u otros elementos relevantes para la exportación.

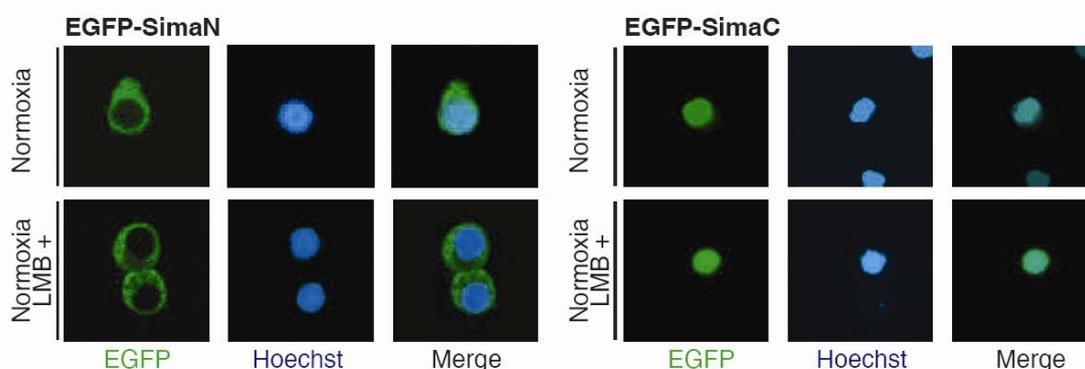


Figura 21: La localización citoplasmática de Sima depende de su porción N-terminal. EGFP-SimaN se encuentra localizada en el citoplasma y es insensible a LMB. EGFP-SimaC se localiza constitutivamente en el núcleo, sugiriendo la presencia de NESs en la porción N-terminal de la proteína.

3- Sima contiene dos motivos de unión a CRM1 en su región N-terminal.

Dado que la remoción de la región N-terminal de Sima provoca su acumulación en el núcleo (Fig. 21), analizamos la presencia de posibles NESs en esta región utilizando el programa NES Finder 2.0 (<http://research.nki.nl/fornerodlab/NES-Finder.htm>), el cual detecta el consenso [FILMV]-X(2-3)-[FILMV]-X(2-3)-[FIL]-X [not:FILMVW]-[FILMV]. Este análisis reveló que en la secuencia primaria de Sima existen cuatro motivos ricos en leucinas que podrían corresponder a NES funcionales (NES1-4 en la Fig. 22A). La NES1 y la NES2 mapean en la mitad N-terminal entre los aminoácidos 92-101 y 115-124 y la NES3 y la NES4 se hallan en la mitad C-terminal entre los residuos 1011-1020 y 1131-1140 respectivamente. Estas presuntas NESs contienen respectivamente los siguientes espaciamentos entre residuos hidrofóbicos: NES1: 2-3-1; NES2: 3-2-1; NES3: 2-3-1 y NES4: 3-2-1. Notablemente, la

presunta NES puede resultar de ayuda para predecir su funcionalidad. Como explicamos en la introducción, una NES reside en una superficie expuesta de la proteína, usualmente un α -hélice, inmersa dentro de una región altamente flexible (la Cour y col., 2004), donde tres de los cuatro residuos hidrofóbicos que definen la NES protruyen hacia un mismo lado de la hélice y el cuarto residuo mira hacia el lado opuesto (Rittinger y col., 1999).

Basándonos en estas premisas y usando como template estructuras de proteínas bHLH que han sido resueltas, decidimos modelar la estructura de la región de Sima que contiene la NES1 y la NES2. Como hemos detallado más arriba, las dos NESs putativas se encuentran dentro del dominio bHLH, el cual incluye dos α -hélices separadas por un lazo (*loop*). Utilizando los programas PredictProtein, Jpred y PSIPRED, pudimos inferir que tanto la NES1 como la NES2 se ubicarían respectivamente, dentro de la primera y de la segunda hélice del dominio bHLH de Sima (Fig. 22). A continuación, para intentar predecir cuál sería la posición relativa de los cuatro aminoácidos hidrofóbicos en la NES1 y la NES2, modelamos la estructura del dominio bHLH de Sima utilizando los datos de estructuras cristalográficas de otras proteínas bHLH tales como PHO4 (PDB:1A0A) y MyoD (PDB:1MDY), como así también utilizamos un modelado previamente realizado del dominio bHLH de HIF1- α (Michel y col., 2000). En la figura 23 se observa el modelado del dominio bHLH de Sima, donde observamos que ambas NESs presentarían una disposición espacial de sus aminoácidos hidrofóbicos idéntica a la otras NESs descriptas anteriormente, donde el cuarto residuo hidrofóbico estaría orientado de manera opuesta con respecto a los otros 3 residuos hidrofóbicos dentro de cada una de las α -hélices (Fig. 23). Asimismo, ajustándose a lo descripto previamente para otras NES, cada una de las dos NESs del dominio bHLH de Sima se encontraría ubicada justo en la transición de las dos α -hélices. Estos datos predictivos sugieren que la NES1 y la NES2 podrían representar verdaderas señales de exportación nuclear que interaccionarían con CRM1.

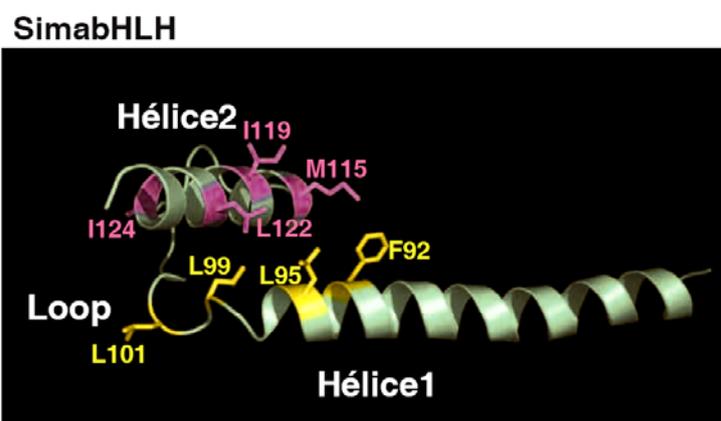


Figura 23: Modelo de la estructura del dominio bHLH de Sima. Los aminoácidos que definen la secuencia consenso de unión de CRM1 están marcados en color, amarillo para la NES1 y rosado para la NES2. Tanto en la NES1 como en la NES2, los tres primeros aminoácidos hidrofóbicos mirarían hacia un lado de la hélice, mientras que el cuarto residuo miraría hacia el lado opuesto.

5- Los motivos NESs del dominio bHLH de Sima son necesarios para su localización citoplasmática.

Para determinar si las putativas NESs encontradas en el dominio bHLH de Sima son necesarias para la localización citoplasmática de la proteína, se realizó una microdelección de 47aa que incluye a ambas posibles NESs. La proteína conteniendo esta delección (Sima Δ HLH) fue fusionada a EGFP en su extremo N-terminal (EGFP-Sima Δ HLH) y la construcción fue luego transfectada en células S2. Se analizó la localización subcelular en presencia o en ausencia de LMB, determinándose la significancia de los resultados mediante el test de Chi cuadrado. EGFP-Sima Δ HLH presentó una localización claramente más nuclear que la de EGFP-Sima (Fig. 24) y notablemente, la sensibilidad a LMB exhibida por la construcción EGFP-Sima (se torna mas nuclear) desapareció en la quimera EGFP-Sima Δ HLH (Fig. 24B). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que dentro del motivo HLH de Sima existen NES que median la exportación nuclear de la proteína de manera dependiente de CRM1.

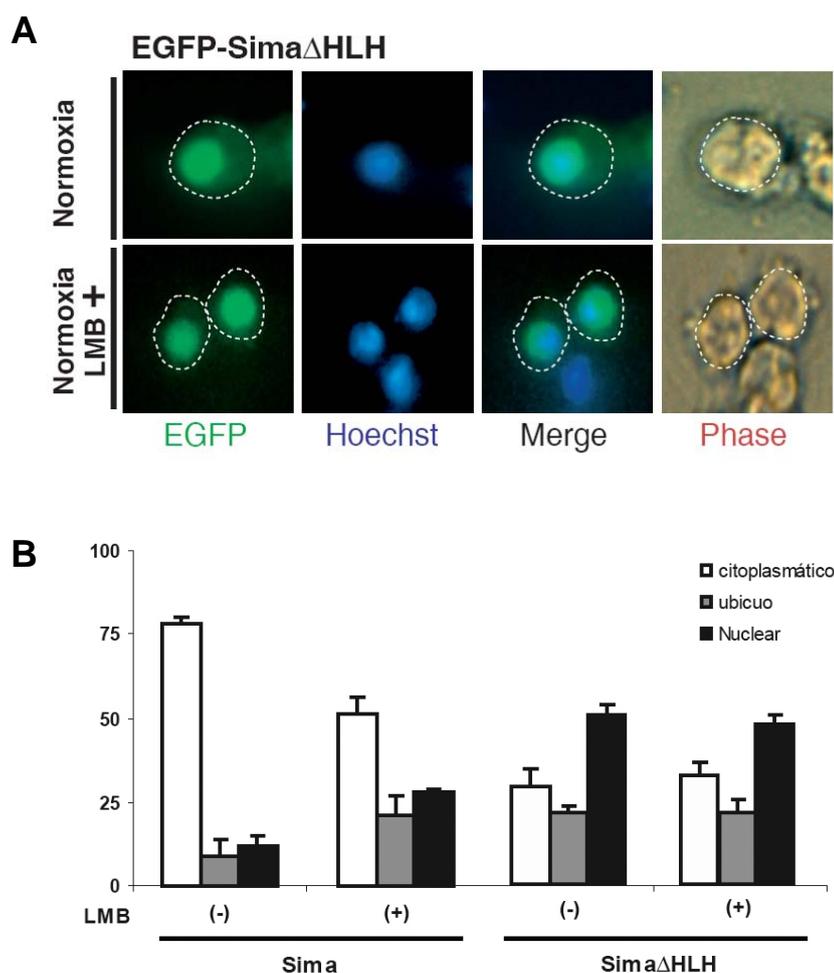


Figura 24: El dominio bHLH le confiere a Sima sensibilidad a LMB. Se transfectó de manera estable la proteína de fusión EGFP-Sima Δ HLH en células S2 y se analizó su localización subcelular en normoxia (21% O₂) en ausencia o presencia de LMB. A) Microscopía de fluorescencia. B) Cuantificación de las células según la localización subcelular de las fusiones a EGFP, clasificadas en tres categorías: “Citoplasmática”, “Ubicua” y “Nuclear”. La delección del dominio bHLH en la quimera Sima Δ HLH provoca un aumento en la localización nuclear de la proteína comparada con Sima salva, además de la pérdida de sensibilidad a LMB.

Los experimentos descritos hasta aquí fueron realizados en células S2. Si bien este sistema celular constituye una herramienta útil en estudios de biología celular y molecular, las células S2 presentan algunas desventajas, tales como su inestabilidad genética que puede dar lugar a resultados artefactuales. Por este motivo, era importante determinar si la alteración de la localización subcelular de Sima Δ HLH se reproducía *in vivo*, en un modelo de embriones transgénicos.

Previamente, utilizando el sistema Gal4/UAS en embriones de *Drosophila*, se había determinado en el laboratorio que Sima se encuentra mayoritariamente en el citoplasma en normoxia y en el núcleo en hipoxia (Fig. 25A) (Lavista-Llanos Tesis Doctoral 2004)

(Dekanty y col., 2005; Lavista-Llanos y col., 2002). En esos experimentos se utilizó el promotor del gen *engrailed* (*en*) para dirigir la expresión de Sima en 14 bandas correspondientes a los dominios de expresión de *engrailed* entre los estadios embrionarios 11 y 16 (Fig. 25B).

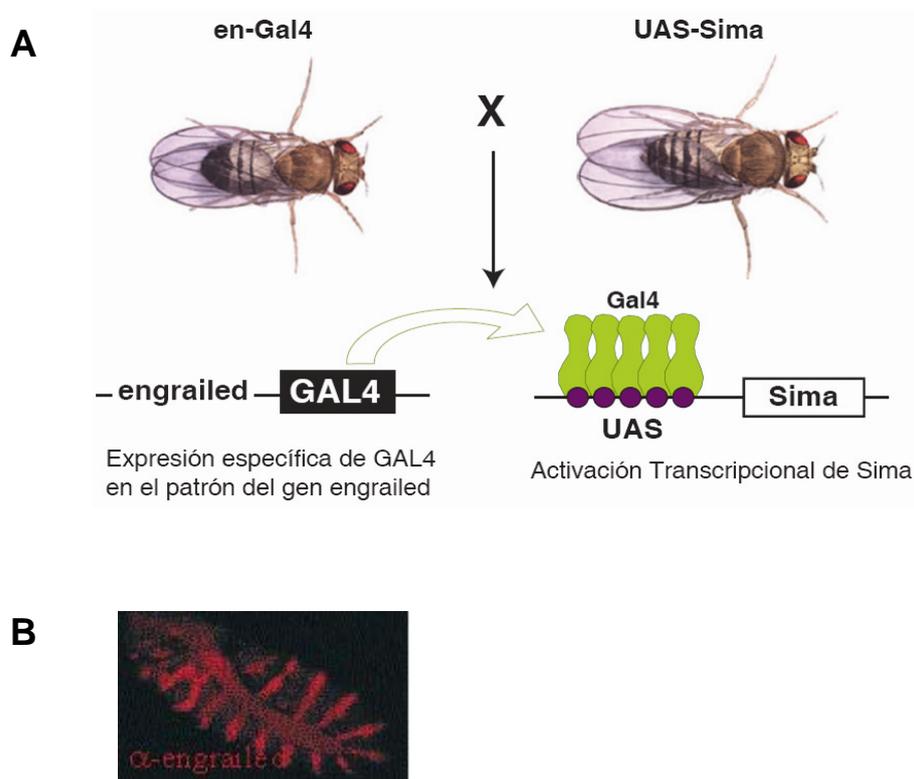


Figura 25. Sistema UAS-Gal4 utilizando el promotor del gen *engrailed*. A) La proteína heteróloga gal4 expresada en el patrón de engrailed se une a la secuencia UAS, activando la transcripción del gen *Sima*. B) Patrón de expresión de la proteína Engrailed endógena.

Al igual que en los experimentos llevados a cabo en células S2, se establecieron tres categorías de localización subcelular de Sima: **citoplasmática** (embriones en los que más del 90% de las células de las bandas que expresan *engrailed* presentan a la proteína localizada en el citoplasma); **nuclear** (embriones con más del 90% de las células de las bandas de *engrailed* que exhiben la proteína en dicho compartimento) y **ubicua** (cuando el embrión no se encuentra dentro de ninguna de las otras dos categorías)(Dekanty y col., 2005). La localización subcelular de Sima fue analizada por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que reconoce la porción amino-terminal de la proteína (Bacon y col., 1998) y se cuantificaron los resultados de manera independiente en cada uno de los estadios

embrionarios, a diferentes concentraciones de oxígeno (Dekanty y col., 2005). La figura 26A muestra grupos de células ectodérmicas de embriones representativos de cada categoría y los patrones de distribución de la localización subcelular de Sima en normoxia (21% O₂) y en hipoxia (1% ; 3% ; 5% O₂) se muestran en la figura 26B (Dekanty y col., 2005).

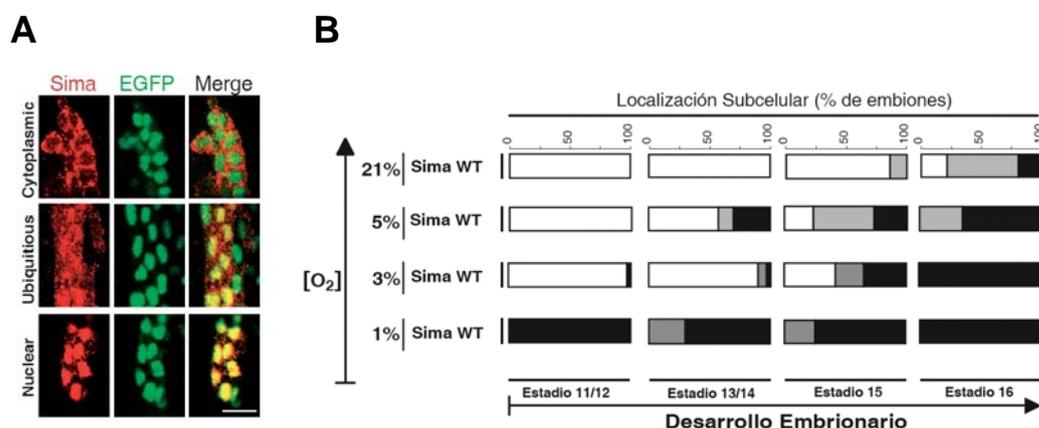


Figura 26: Análisis cuantitativo de la localización Subcelular de Sima. (A) Experimentos de inmunofluorescencia mostrando la expresión simultánea de Sima y una variante de EGFP conteniendo una NLS en embriones transgénicos bajo el control del promotor de *engrailed*. Se definieron tres categorías de localización: “citoplasmática”, “ubicua” y “nuclear”. (B) La localización de Sima en embriones fue progresivamente más nuclear conforme avanza la embriogénesis y gradualmente más nuclear a medida que disminuyen los niveles de oxígeno (Chi-cuadrado (χ^2); $p < 10^{-2}$; $n > 30$). Color blanco: localización citoplasmática; color gris: localización ubicua; color negro: localización nuclear.

Para analizar el comportamiento de Sima Δ HHLH *in vivo*, generamos líneas de moscas transgénicas que expresaran esta variante de Sima bajo el control del promotor UAS. Tras el cruzamiento con la línea inductora en-Gal4, Sima Δ HHLH fue claramente más nuclear que la proteína salvaje y esto pudo comprobarse a diferentes concentraciones de oxígeno (3%, 5% y 21%) a lo largo de la embriogénesis (fig. 27). La significancia de los resultados fue analizada mediante el test de Chi cuadrado utilizando un N mayor que 30 para cada estadio embrionario y para cada concentración de oxígeno analizada. La distribución de Sima Δ HHLH a 3%, 5% y 21% de oxígeno fue significativamente más nuclear que la de Sima en las mismas condiciones. Sin embargo, cuando ambas construcciones se sometieron a condiciones extremas de hipoxia (1% de O₂), su localización subcelular fue semejante, localizándose ambas preponderantemente en el núcleo. Estos resultados, junto a los descriptos más arriba, sugieren que al menos una de las presuntas NES, localizadas en el dominio bHLH de Sima

contribuye a su localización citoplasmática en normoxia y que dicha localización depende de CRM1.

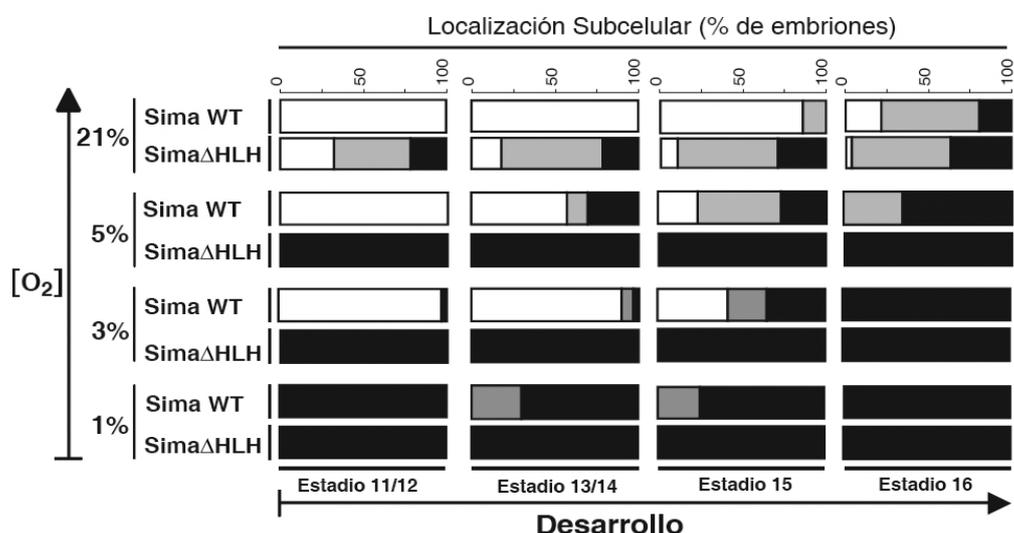


Figura 27: El dominio bHLH de Sima contribuye a la localización citoplasmática de la proteína en normoxia. Análisis cuantitativo de la localización subcelular de Sima y SimaΔHLH en embriones transgénicos a diferentes concentraciones de oxígeno a lo largo de la embriogénesis. Color blanco: localización citoplasmática; color gris: localización ubicua; color negro: localización nuclear. La proporción de embriones con localización nuclear de SimaΔHLH fue superior a la de Sima salvaje a diferentes concentraciones de oxígeno (21%, 5%, 3% O₂) ($p < 10^{-2}$; $n > 30$). A 1% de O₂ tanto Sima como SimaΔHLH se localizan casi exclusivamente en el núcleo en todos los estadios embrionarios.

6- Sima se exporta rápidamente luego de la reoxigenación de los embriones

Una pregunta que nos hemos hecho en esta Tesis es en qué circunstancias la exportación nuclear de Sima cobraría mayor relevancia fisiológica y cuáles son los mecanismos que median esa exportación. En hipoxia, la proteína se encuentra localizada preponderantemente en el núcleo. Por lo tanto, es de esperar que cuando los niveles de oxígeno se restablecen (reoxigenación), Sima deberá ser rápidamente exportada al citoplasma hasta recuperar la situación de equilibrio en normoxia. Por lo tanto, un experimento de reoxigenación nos permitiría analizar el proceso de exportación en una circunstancia en la que la exportación se constituye como el principal mecanismo regulatorio.

Para estudiar la variación de la localización subcelular de Sima durante la reoxigenación, los embriones expresando Sima en el patrón de *engrailed* fueron sometidos a cuatro horas de hipoxia extrema (1% O₂), posteriormente fueron transferidos a normoxia y fijados a diferentes tiempos luego de la reoxigenación (0, 5, 10 y 15 minutos). La localización subcelular de la proteína fue analizada por inmunofluorescencia, cuantificando los resultados

en categorías como se describió mas arriba. En la figura 28 se muestra de qué manera disminuye la proporción de embriones clasificados como “nucleares” luego de la reoxigenación, proporcionando una medida de la cinética de la exportación de Sima. Obsérvese que dicha cinética varía ligeramente a lo largo de la embriogénesis (test de Kaplan-Meier con $N > 30$). Esta cinética sigue una ecuación exponencial ($y = 100 e^{-k(x-T_{lag})}$), donde T_{lag} es el tiempo que demora en iniciarse la exportación y $T_{1/2}$ ($T_{1/2} = t_{lag} + \ln 0.5 / -k$) es el tiempo necesario para que el 50% de Sima sea exportada al citoplasma. Notablemente, en el estadio 15 (St15) el $T_{1/2}$ de la proteína salvaje es de aproximadamente 3 minutos (Fig. 28B). Este sistema es altamente sensible para estudiar el proceso de exportación nuclear de Sima, por lo que decidimos utilizarlo al lo largo de la Tesis para el análisis del comportamiento de distintas variantes de la proteína que hemos generado.

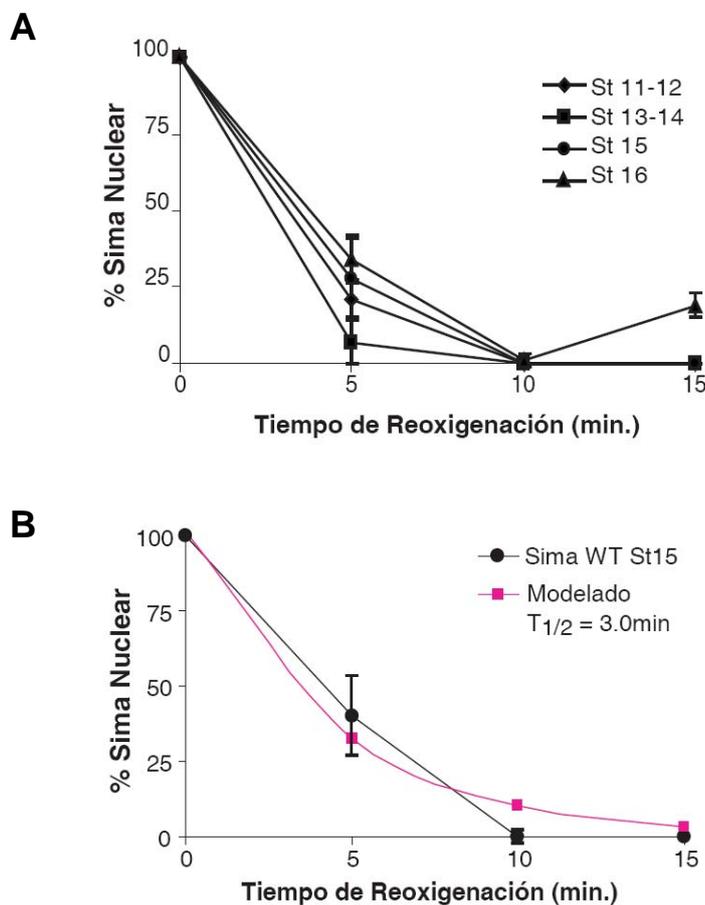


Figura 28: Cinética de exportación de Sima. Sima es totalmente exportada en diez minutos después de la reoxigenación en todos los estadios embrionarios. (A) Los embriones expuestos a 1% O₂ durante cuatro horas fueron transferidos a normoxia y fijados a distintos tiempos después de la reoxigenación. Mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Sima se terminó cómo varía la proporción de embriones de cada estadio clasificados como “nucleares”. Las diferentes curvas fueron comparadas mediante el test de Kaplan-Meier ($p < 10^{-4}$; $n > 30$). (B) Modelado matemático de la cinética de exportación de Sima en el estadio embrionario 15 (St15). Se estimó un tiempo medio de exportación de 3 minutos.

7- El dominio bHLH es necesario para la exportación nuclear de Sima

Una vez establecido que el dominio bHLH es necesario para la normal regulación de la localización subcelular de Sima en condiciones de equilibrio, buscamos evidencias directas de que este dominio estuviese involucrado en el proceso de exportación nuclear. Se utilizó el ensayo de reoxigenación descrito más arriba para comparar embriones que sobre-expresan Sima Δ HLH con embriones que expresan la proteína salvaje. A 1% O₂, tanto Sima como Sima Δ HLH se localizaron exclusivamente en el núcleo (Fig. 27) pero luego de la reoxigenación, Sima Δ HLH mostró una cinética de exportación notablemente más lenta que la de Sima salvaje en todos los estadios embrionarios estudiados. En la figura 29 se muestra la cinética de reoxigenación de embriones de estadio 15 la cual es representativa de lo que ocurre en otros estadios (no mostrado); el T_{1/2} de Sima Δ HLH fue de 22 minutos, contrastando con los 3 minutos calculados para Sima salvaje. Estos resultados sugieren fuertemente que el motivo HLH de Sima es necesario para la exportación nuclear de la proteína.

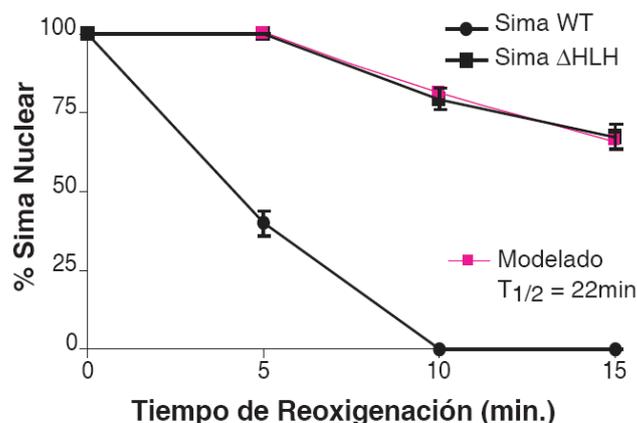


Figura 29: La velocidad de exportación de Sima Δ HLH se encuentra muy reducida.

Embriones expuestos a 1% O₂ durante cuatro horas fueron transferidos a normoxia y fijados a distintos tiempos después de la reoxigenación. Se muestran los datos de embriones de estadio 15, el cual es representativo de los resultados en todos los estadios. Las diferentes curvas fueron comparadas mediante el test de Kaplan-Meier ($p < 10^{-4}$; $n > 30$). Se muestra el modelado matemático de la cinética de exportación de Sima Δ HLH. El tiempo medio de exportación de Sima Δ HLH fue calculado en 22 minutos, contrastando con los 3 minutos estimados para Sima salvaje.

8- Identificación de las NESs funcionales de Sima

8.1- Fusiones de las NES a EGFP y análisis de la localización subcelular en células S2

Para examinar si las NESs del dominio bHLH de Sima son potencialmente funcionales, evaluamos la capacidad del motivo HLH aislado de dirigir la exportación nuclear de un reportero EGFP. Fusionamos la porción HLH de Sima (aminoácidos 77-130) a EGFP (EGFP-SimaHLH), transfectamos las construcciones en células S2 y estudiamos su localización subcelular por microscopía confocal (Carl Zeiss LSM5, Pascal). Utilizando el software LSM Image Browser, medimos la intensidad promedio de la fluorescencia correspondiente a EGFP en el núcleo y en el citoplasma, y calculamos la relación de intensidades de fluorescencia entre ambos compartimentos (“relación núcleo/citoplasma; N/C). Se cuantificó un número mínimo de 13 células en cada condición y se definió la significancia de los resultados mediante el test T de Student.

Inicialmente, determinamos la localización subcelular de EGFP; esta proteína difunde libremente entre el núcleo y el citoplasma debido a su pequeño tamaño, mostrando una relación N/C de 1.4 (Fig. 30A, 31). Como control positivo del experimento, utilizamos una variante de EGFP fusionada a la NES del inhibidor de la proteína kinasa A, la cual había sido descrita previamente (EGFP-NES) (Wen y col., 1995). De acuerdo a lo esperado, EGFP-NES mostró una localización claramente más citoplasmática que EGFP sola, con una relación N/C de 0.6 (Fig. 30B, 31). A continuación, procedimos a analizar la localización subcelular de EGFP-SimaHLH; como muestra la figura 30C, esta fusión exhibió una distribución similar al control positivo EGFP-NES, con una relación N/C de 0.8 (Fig. 31), sugiriendo nuevamente que el dominio HLH de Sima incluye una NES funcional. Consistente con esto, tras el agregado de LMB, la localización tanto de EGFP-SimaHLH como la del control positivo EGFP-NES se tornó marcadamente más nuclear (relación N/C de 1.3 y 1.2 respectivamente) (Fig. 30B, C, 31). Estos resultados indican que el dominio bHLH de Sima contiene señales de exportación nuclear funcionales que pueden operar incluso encontrándose aisladas del entorno de la proteína completa.

Utilizando la misma estrategia, analizamos la capacidad de promover la exportación nuclear de 10 aminoácidos que incluyen a la NES1 (**FMELSAALPL**) y de 16 residuos que incluyen a la NES2 (**MRITIAFLKIREMLQF**). Con estas secuencias generamos las quimeras EGFP-NES1 y EGFP-NES2 y estudiamos su localización subcelular en células S2 en presencia o ausencia de LMB como fue detallado en el experimento anterior. La NES2 (N/C=0.6) pero no la NES1 (N/C=1.3) fue capaz de promover la exportación del reportero EGFP (Fig. 30D, E, 31) y el tratamiento con LMB provocó un claro incremento de la localización nuclear de EGFP-NES2 con una relación N/C de 0.9, pero no afectó la localización de EGFP-NES1 (N/C=1.3).

Como mencionamos más arriba, existen evidencias que indican que la estructura secundaria de la NES es necesaria para que la proteína cargo pueda ser exportada al citoplasma. Bajo la presunción de que la secuencia utilizada en la fusión de la NES1 fuera demasiado corta para preservar la estructura secundaria, decidimos realizar una segunda fusión de la NES1 a EGFP tratando de abarcar parte del entorno de la NES1 presumiblemente suficiente para establecer una α -hélice. Predijimos la capacidad de una nueva quimera de formar una α -hélice en base a la probabilidad de que un determinado residuo aminoacídico se ubique en la posición de iniciación (N-cap) o de terminación (C-cap) de una α -hélice, teniendo en cuenta al menos tres residuos río arriba y tres residuos río abajo de los aminoácidos de los extremos de la hélice (Kruus y col., 2005). Esto, sumado al hecho de que Sima posee una NLS predicha en la región básica del dominio bHLH río arriba de la presunta NES1 (lo cual podría complicar la interpretación de los resultados), nos llevó a seleccionar veinticinco aminoácidos (SRDAARCRRSKETEIFMELSAALPL, aa 77-101) para generar la fusión a EGFP (EGFP-NES1-25aa). La primera arginina de esta secuencia cumpliría la función de N-cap y la última alanina la función de C-cap. EGFP-NES1-25aa, mostró el mismo comportamiento que la quimera anterior que contenía diez aminoácidos, observándose una localización ubicua tanto en ausencia como en presencia de LMB, con una relación N/C de 1.3 en ambos casos (resultados no mostrados).

Debido a que la exportación nuclear de Sima Δ HLL se encuentra disminuida pero no bloqueada, sospechamos que la proteína podría ser exportada mediante alguna NES adicional o mecanismo alternativo. Por lo tanto, decidimos analizar la funcionalidad de las otras dos NESs predichas en la secuencia primaria de Sima (NES3 y NES4), ambas ubicadas fuera del dominio bHLH. Fusionamos a EGFP dieciséis residuos que incluyen a la NES3 (EFRTFQQLQQELQLQEEQ) o a la NES4 (QQQNILNAVPLITIQNNKEL), generando las quimeras EGFP-NES3 y EGFP-NES4 para posteriormente examinar su localización subcelular y su sensibilidad a LMB en células S2. Como se muestra en la figura 30F; G, ninguna de las dos señales de exportación, NES3 o NES4, fue capaz de promover la exportación nuclear del reportero EGFP, observándose una relación N/C de 1.3 - 1.4 en ambos casos (Fig. 31). Ninguna de las dos quimeras fue sensible a LMB, indicando que, al menos estando aisladas de su entorno proteico, ni la NES3 ni la NES4 son funcionales.

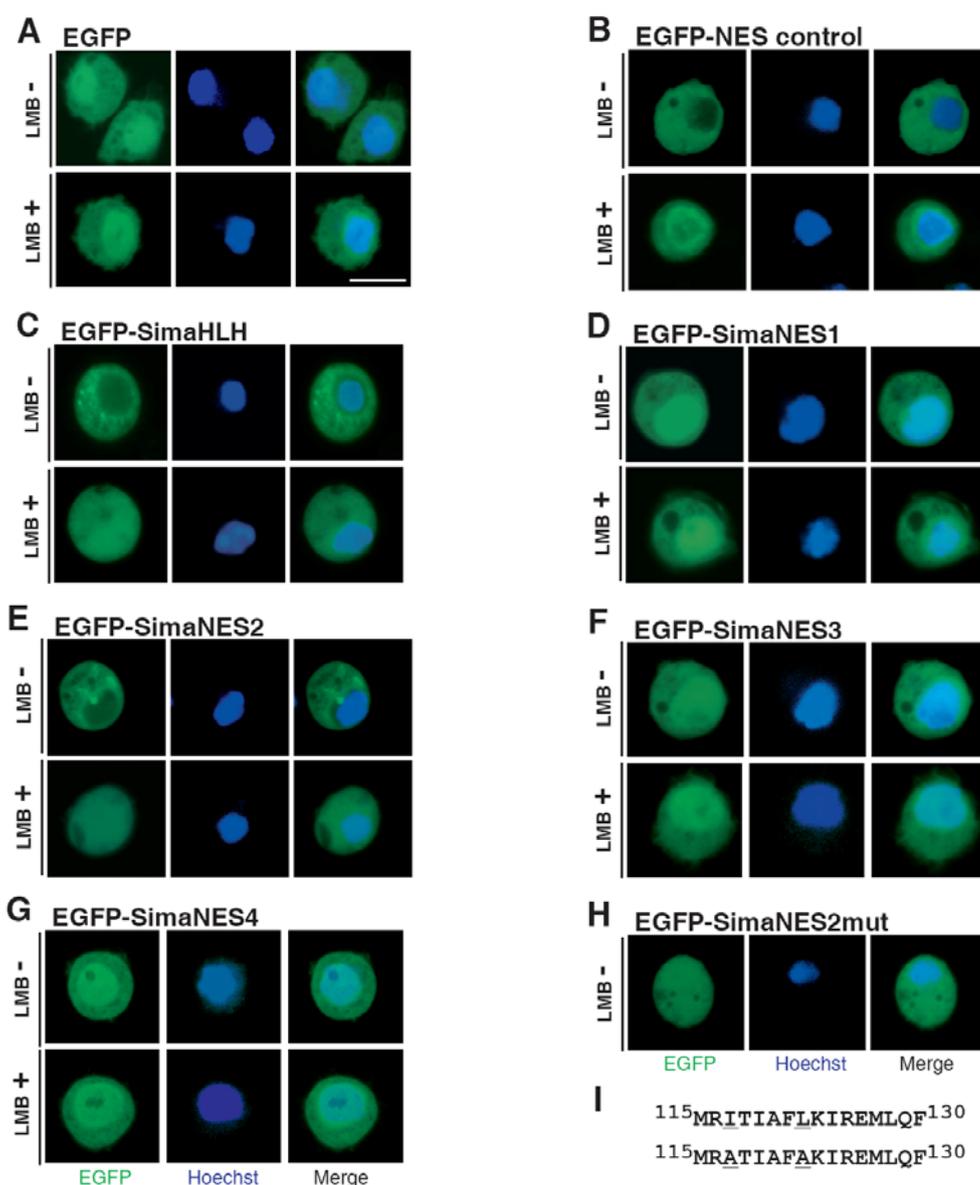


Figura 30: La NES2 de Sima es capaz de promover la exportación nuclear del reportero EGFP. (A-H) Se transfectaron en células S2 diferentes quimeras en las que porciones de Sima fueron fusionadas a EGFP; las células fueron tratadas o no con LMB seis horas después de inducir la expresión con CuSO₄. La localización subcelular se analizó por microscopía confocal (Barra de escala: 10µm). (H) Localización subcelular de la variante mutada de EGFP-NES2 en la secuencia consenso reconocida por CRM1. (I) Se indican los residuos mutados (subrayados) dentro de la NES2.

Dado que la NES2 fue capaz de dirigir la exportación del reportero EGFP, procedimos a examinar si mutaciones dentro de dicha NES podían afectar la localización subcelular de la quimera. Al remplazar por alaninas dos de los aminoácidos hidrofóbicos de la NES2 se observó un claro incremento de la localización nuclear de la quimera (N/C=1.0) (Fig. 30 H, I,

31), demostrando que estas mutaciones alteran la exportación nuclear de la quimera. Sin embargo, la quimera EGFP-NES2mut aún mostró sensibilidad a LMB (Fig. 30), lo cual indica que las mutaciones alteraron pero no destruyeron totalmente la interacción con CRM1. Estos resultados sugieren que la NES2 es funcional y conserva la capacidad de promover la exportación, aún estando aislada de su entorno proteico normal.

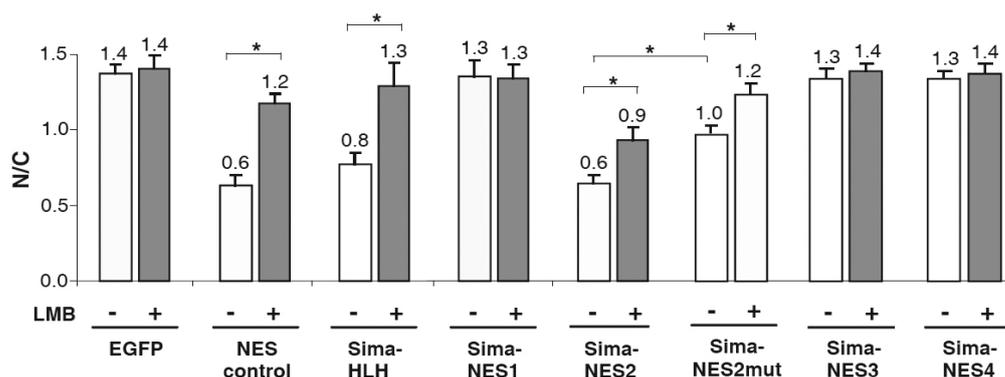


Figura 31: La NES2 es funcional y sensible a LMB. Se analizó un número mínimo de 13 células para cada condición y construcción y se midió la intensidad promedio de la fluorescencia de EGFP en el núcleo (N) y en el citoplasma (C); en el gráfico se representa la relación N/C (Student t test; *: $p < 10^{-4}$; $n > 10$). Nótese que tanto Sima-HLH como Sima-NES2 y SimaNES2mut son sensibles a LMB y que la localización de SimaNES2mut es significativamente más nuclear que la de SimaNES2.

8.2- Análisis de la funcionalidad de las NESs en el contexto de la proteína entera en embriones transgénicos

La fusión de péptidos candidatos (posibles NES) al reportero EGFP para el estudio de la localización subcelular en células en cultivo es un ensayo relativamente simple y rápido que puede proveer una primera evidencia de la funcionalidad de una posible NES. Sin embargo, si una secuencia determinada no es capaz de dirigir la exportación del reportero, ello no elimina la posibilidad de que la secuencia pueda ser funcional en el contexto de la proteína entera (Engel y col., 1998).

8.2.1- Efectos de la delección de la NES1 o la NES2 en la localización subcelular de Sima en embriones transgénicos

Con el objeto de evaluar el rol de las NESs del dominio bHLH en la exportación nuclear de Sima, generamos líneas de moscas transgénicas con variantes de Sima que contienen

deleciones de diez aminoácidos correspondientes a la NES1 o la NES2. Estas variantes, Sima Δ NES1 y SIMA Δ NES2, están bajo el control del promotor UAS, el cual permite la expresión por cruzamiento con la línea inductora en-Gal4. Tanto Sima Δ NES1 como Sima Δ NES2 fueron claramente más nucleares que la proteína salvaje y esto pudo verificarse a diferentes concentraciones de oxígeno (3%, 5% y 21%) a lo largo de la embriogénesis (Fig. 32). La significancia de los resultados fue analizada mediante el test de Chi cuadrado utilizando un N mayor que 30 para cada estadio embrionario y para cada condición. En condiciones de extrema hipoxia (1% de O₂), todas las variantes de Sima aparecieron localizadas casi exclusivamente en el núcleo de las células embrionarias, no habiendo prácticamente diferencias entre Sima, Sima Δ NES1 y Sima Δ NES2.

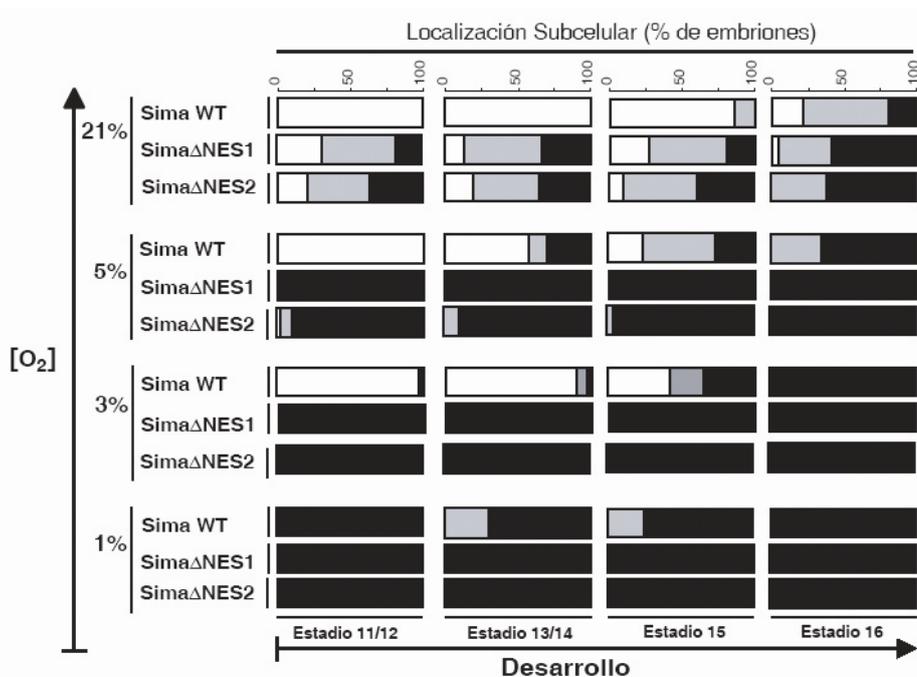


Figura 32: La delección de 10 aminoácidos correspondientes a la NES1 o a la NES2 de Sima modifica su localización subcelular en embriones transgénicos. Análisis cuantitativo de la localización subcelular de Sima, Sima Δ NES1 o Sima Δ NES2 en embriones transgénicos (*en-Gal4/UAS-Sima*) a diferentes concentraciones de oxígeno a lo largo de la embriogénesis. Color blanco: localización citoplasmática; color gris: localización ubícua; color negro: localización nuclear. En Sima Δ NES1 y Sima Δ NES2 se observa un incremento de la proporción de embriones clasificados como “nucleares” en comparación con los que expresan a Sima salvaje. Esto pudo verificarse a diferentes concentraciones de oxígeno (21%, 5%, 3% O₂) ($p < 10^{-2}$; $n > 30$). A 1% de O₂ todas las variantes de Sima se localizan casi exclusivamente en el núcleo de todos los estadios embrionarios analizados.

Con la finalidad de estudiar el proceso de exportación de Sima de manera directa y, aprovechando que todas las variantes de Sima exhiben una localización exclusivamente nuclear en hipoxia extrema, decidimos realizar experimentos de reoxigenación como los que se detallaron más arriba. La figura 33 muestra que tanto Sima Δ NES1 como Sima Δ NES2 son exportadas del núcleo más lentamente que Sima salvaje. El modelado matemático del proceso permite inferir un $T_{1/2}$ de 15 y 16 minutos respectivamente para Sima Δ NES1 y Sima Δ NES2. Este resultado sugiere que las dos presuntas NESs localizadas en el dominio bHLH de Sima contribuirían a su exportación nuclear en el contexto de la proteína entera.

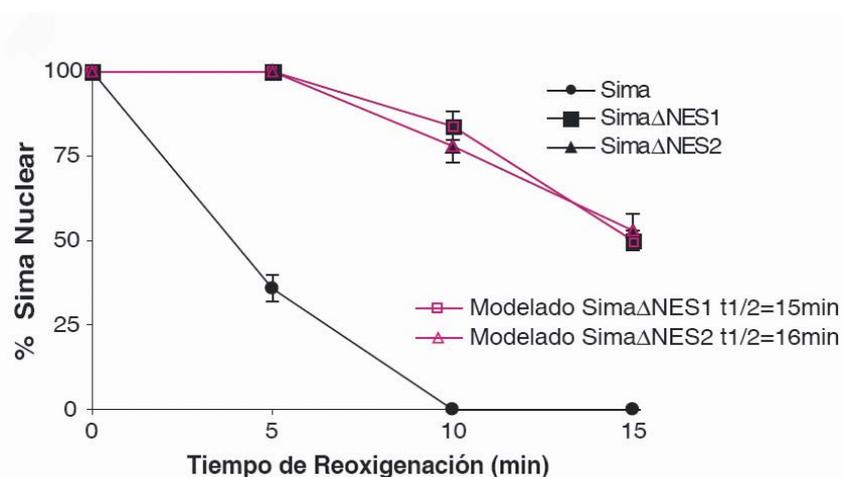


Figura 33: Tanto Sima Δ NES1 como Sima Δ NES2 tienen reducida su velocidad de exportación nuclear. Embriones transgénicos expresando Sima o sus variantes mutadas fueron sometidos a hipoxia (1% O₂) durante 4 horas para posteriormente ser transferidos a condiciones de normoxia (21% O₂). Los embriones fueron fijados y teñidos contra Sima a diferentes tiempos desde el comienzo de la reoxigenación. Se muestra el comportamiento de los embriones del estadio 15. Los datos fueron analizados mediante el test de Kaplan-Meier ($p < 10^{-4}$; $n > 30$). Se muestra el modelado matemático de la cinética de exportación de Sima Δ NES1 y Sima Δ NES2. Se calcula un tiempo medio de exportación de estas variantes mutadas de Sima en 15 y 16 minutos respectivamente, en contraste con los 3 minutos calculados para Sima salvaje.

8.2.2- Efecto de mutaciones en la NES1 o la NES2 sobre la localización subcelular de Sima

Debido a que modificaciones drásticas en la secuencia de una proteína pueden provocar profundas alteraciones de su estructura tridimensional, nos preguntamos si la delección de la NES1 o la NES2 estarían modificando la estructura tridimensional del dominio y por ende, afectando de manera indirecta el proceso de exportación. Para descartar esta posibilidad,

realizamos mutaciones puntuales en la NES1 y la NES2, en las cuales dos de los cuatro aminoácidos hidrofóbicos consenso para la unión a CRM1 fueron remplazados por leucinas en cada una de las NESs (Sima.mNES1 y Sima.mNES2; Fig. 34A). Se evaluó la capacidad de exportación nuclear de las variantes mutadas, analizando la localización subcelular de Sima en experimentos de reoxigenación como los descritos más arriba. En la figura 34B se observa que la exportación nuclear de Sima.mNES1 y Sima.mNES2 se vió severamente afectada en comparación con Sima salvaje (Kaplan-Meier; $p < 10^{-4}$; $n > 30$). El modelo matemático que mejor ajusta a la cinética de exportación de estas variantes sugiere un $T_{1/2}$ para Sima.mNES1 y Sima.mNES2 de 17 y 15 minutos, respectivamente. Estos resultados refuerzan el concepto de que tanto la NES1 como la NES2 son funcionales.

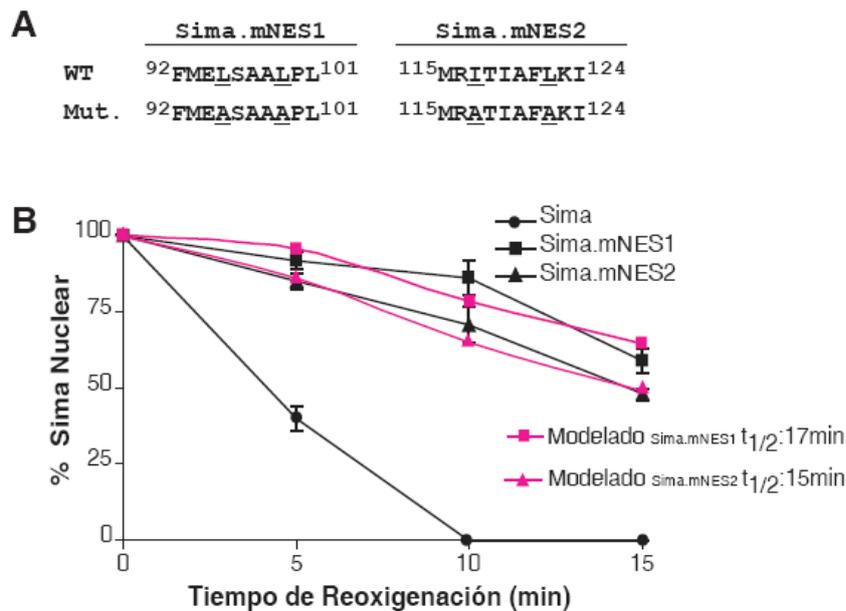


Figura 34: La mutagénesis de la NES1 o de la NES2 de Sima provocan defectos en la exportación nuclear en experimentos de reoxigenación de embriones transgénicos. (A) Se subrayan los residuos mutados en la NES1 o en la NES2. (B) Los embriones fueron expuestos a 1% de O₂ durante 4 horas, posteriormente fueron transferidos a condiciones de normoxia y teñidos contra Sima a diferentes tiempos luego de la reoxigenación. La velocidad de exportación de las variantes mutadas en la NES1 o la NES2 revela la importancia que estas secuencias tienen en el proceso de exportación (Kaplan-Meier; $p < 10^{-4}$; $n > 30$).

8.2.3- Mutaciones en las presuntas NES3 o NES4 no tienen efecto sobre la exportación

Si bien los experimentos de fusión a EGFP sugieren que las señales de exportación 3 y 4 no son capaces por sí solas de dirigir la exportación de una proteína reportera, faltaba aún analizar su posible funcionalidad en el contexto de la proteína entera. Siguiendo el procedimiento descrito más arriba, generamos formas mutagenizadas de Sima en las que dos de los cuatro residuos hidrofóbicos de la NES3 o la NES4 fueron remplazados por alaninas (Sima.mNES3, Sima.mNES4) (Fig. 35A). Establecimos líneas de moscas transgénicas para cada una de estas mutantes de Sima y analizamos la exportación nuclear utilizando el ensayo de reoxigenación. En la figura 35B puede verse que Sima.mNES3 y Sima.mNES4 se exportan a la misma velocidad que Sima salvaje, indicando que ninguna de estas dos secuencias es necesaria en el proceso de exportación.

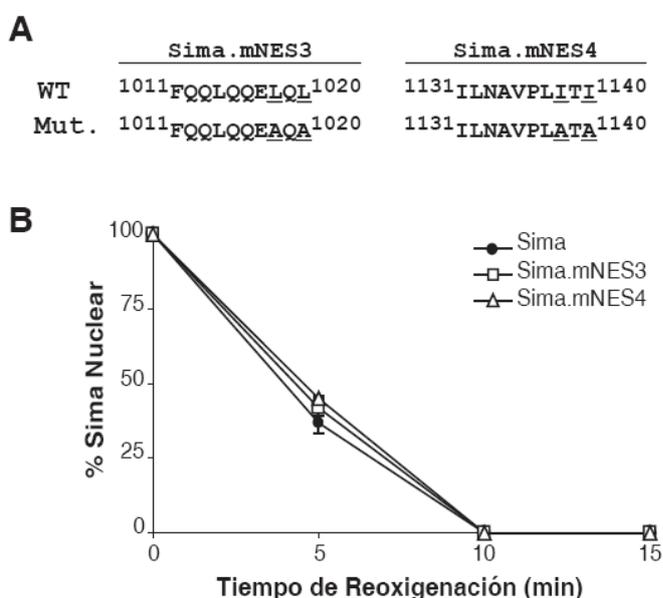


Figura 35: La exportación nuclear de Sima conteniendo mutaciones en la NES3 o en la NES4 es normal. (A) Se subrayan los residuos mutados en la NES3 o NES4. (B) Los embriones fueron expuestos a 1% de O₂ durante 4 horas, luego fueron transferidos a normoxia y teñidos contra Sima a diferentes tiempos luego de la reoxigenación. El comportamiento de las variantes de Sima mutadas en la NES3 o la NES4 es idéntico al de la proteína Sima salvaje.

Estos resultados, sumados a los descriptos más arriba, indican que tanto la NES1 como la NES2 contribuyen a la exportación de Sima de manera dependiente de CRM1 y que ni la NES3 ni la NES4 son relevantes en dicho proceso.

II- LA EXPORTACIÓN DE SIMA COMO MECANISMO DE CONTROL DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA.

Debido a que Sima se mueve continuamente entre el núcleo y el citoplasma, nos preguntamos si la exportación nuclear dependiente de oxígeno es un mecanismo que contribuye a la regulación de su actividad transcripcional. Para analizar este punto nos propusimos medir el grado de activación de la vía de respuesta a hipoxia en embriones que tienen afectado el mecanismo de exportación. Sabiendo que el dominio bHLH de Sima está involucrado en la unión al DNA, como así también en la dimerización con la subunidad β Tango, generamos un nuevo grupo de mutaciones de la NES1 y la NES2 procurando que alteren la capacidad de exportación de la proteína, pero tratando de preservar la estructura de las α -hélices del dominio bHLH para no dañar la actividad transcripcional.

1- Diseño de nuevas mutantes de exportación en el dominio bHLH

Las mutaciones se diseñaron usando el programa de predicción Agadir, el cual se basa en la teoría de transición hélice/coil que considera las interacciones específicas que ocurren en las hélices desprovistas de interacciones terciarias. Se utilizaron también los servidores PredictProtein, Jpred y PSIPRED para predecir posibles cambios en la estructura secundaria provocados por las mutaciones. Asimismo, utilizando el programa I-Mutant2.0 (Capriotti y col., 2005a; Capriotti y col., 2005b) (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant2.0/I-Mutant2.0.cgi>), se intentaron predecir los posibles cambios en la estabilidad de la proteína. En base a estos análisis, se pretendió generar mutaciones puntuales conservativas de manera que, al menos en algunas de ellas, disminuya la exportación de la proteína sin destruir su actividad transcripcional. Se mutó un único residuo hidrofóbico del consenso de unión a CRM1 en cada una de estas nuevas variantes de Sima; se generaron dos mutaciones para la NES1: SimaF92Y y SimaL101A y otras dos mutaciones para la NES2: SimaM115A, SimaI124A (Fig. 36).

NES1	Sima WT	92 <u>F</u> MELSAALPL ¹⁰¹
	SimaF92Y	92 <u>Y</u> MELSAALPL ¹⁰¹
	SimaL101A	92FMELSAAL <u>P</u> A ¹⁰¹
NES2	Sima WT	115MRITIA <u>FLKI</u> ¹²⁴
	SimaM115A	115 <u>A</u> RITIAFLKI ¹²⁴
	SimaI124A	115MRITIAFL <u>K</u> A ¹²⁴

Figura 36: Mutaciones conservativas en la NES1 y la NES2 de Sima. Se subrayan los residuos mutados en cada una de las nuevas mutaciones de la NES1 o la NES2.

2- Actividad transcripcional intrínseca de las nuevas variantes mutadas de Sima

Con el objeto de determinar si las nuevas mutantes de Sima eran capaces de interactuar con la subunidad β , Tango y de unirse al DNA para transactivar los genes blanco, comenzamos por analizar la actividad intrínseca (actividad en condiciones de máxima estimulación del sistema) de estas mutantes. Para ello, se clonaron tanto las variantes mutadas de Sima, como la proteína salvaje en el vector pMT, el cual media la expresión de proteínas en células S2 de *Drosophila* tras la inducción con CuSO_4 . Estas construcciones fueron co-transfectadas en las células junto a un reportero luciferasa inducible por Sima. En este reportero, la luciferasa se expresa bajo el control de una secuencia dimerizada de 51 pb conteniendo los elementos de respuesta a hipoxia (HRE - Hypoxia Response Elements) de la lactado deshidrogenasa murina (HRE-Luc) (Fig. 6) (Dekanty y col., 2005). Una vez transfectados, los cultivos celulares fueron expuestos durante 16 horas al quelante de hierro desferroxiamina (DFO), que simula una condición de hipoxia. En estas condiciones, SimaL101A y SimaM115A retuvieron alrededor del 60% de la actividad de Sima salvaje (Fig. 37), mientras que SimaF92A y SimaI124A indujeron al reportero a niveles similares a los de Sima salvaje. Estas observaciones sugieren que la estructura de la α -hélice se ha preservado en buena medida en todas las mutaciones y que todas las mutantes son capaces de cumplir su función de transactivación (Fig. 37). Estábamos por lo tanto en condiciones de estudiar si la actividad transcripcional del heterodímero Sima-Tango se incrementa debido al bloqueo de la exportación de Sima.

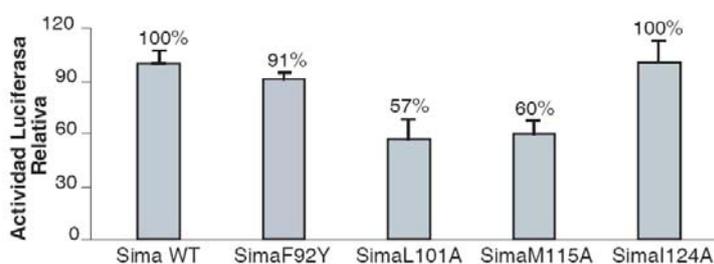


Figura 37: Las mutantes conservativas de la NES1 o la NES2 de Sima son transcripcionalmente activas. Se cotransfectaron células S2 con plásmidos que codifican Sima o variantes mutadas de Sima, junto al plásmido reportero LDH-Luc. Dos días más tarde, las células fueron tratadas con DFO (150 μ M) durante 20 horas y posteriormente se midió la actividad luciferasa. Se muestran los porcentajes de actividad transcripcional que retuvo cada una de las formas mutadas de Sima, en comparación con la de la proteína salvaje.

3- Capacidad de heterodimerización de las mutaciones conservativas de Sima

La capacidad de dimerización de una proteína puede regular su localización subcelular. Específicamente, la localización subcelular de las proteínas bHLH-PAS, Single-minded y Trachealese, es dependiente de la presencia de Tango, su subunidad β (Ward y col., 1998). En el caso de Sima se desconoce aún si se requiere de Tango para que la proteína se localice en el núcleo. Por lo tanto, dado que el dominio bHLH participa en la dimerización de Sima con Tango, analizamos si las mutaciones que generamos en dicho dominio afectan la heterodimerización. Los experimentos fueron llevados a cabo utilizando el sistema del doble híbrido de levaduras y mediante ensayos de co-inmunoprecipitación en un sistema heterólogo de células de mamíferos.

3.1- Análisis de la interacción Sima-Tango en el sistema del doble híbrido de levaduras

Para analizar su interacción con la subunidad β , Tango, clonamos la porción amino terminal (aminoácidos 32-494) de Sima y de las mutantes SimaF92A, SimaL101A, SimaI124A, y SimaM115A en el vector pEG-202, utilizándolas como “carnada”. Para verificar que estas construcciones se expresen a niveles comparables entre sí y además que entren al núcleo para interactuar con el operador de LexA, se utilizó el elemento reportero, pJK101 (Fig. 38). Este reportero contiene la secuencia UAS y el operador LexA (ops) controlando la transcripción de LacZ. Mientras que la unión de Gal4 a las secuencias UAS activa la transcripción de LacZ, la unión de la proteína de fusión a LexA (carnada) al operador LexA la interrumpe. Las levaduras inducen constitutivamente la actividad β -galactosidasa a partir del reportero pJK101 cuando se las crece en medio con galactosa como única fuente de carbono; esto se debe a que el factor de transcripción Gal4 endógeno se une a las secuencias UAS, activando la transcripción de LacZ (Fig. 38A). Si a este sistema se le agrega una proteína de fusión a LexA, dicha proteína se une al operador LexA e interrumpe la transcripción proveniente del sistema Gal4/UAS reprimiendo la actividad β -galactosidasa entre 3 y 20 veces (Fig. 38B). De esta manera, si la transfección de una dada proteína de fusión a LexA produce represión de la actividad β -galactosidasa, se puede estar seguro de que la proteína de fusión es capaz de expresarse, acceder al núcleo y unirse al operador lexA.

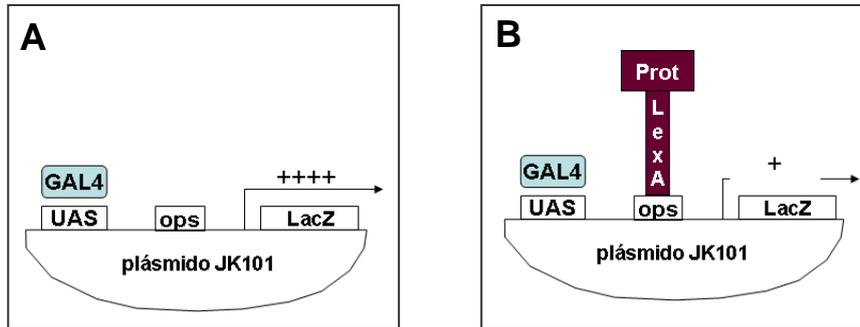


Figura 38: Control de la actividad represora de una proteína de fusión a LexA. (A) Levaduras conteniendo el plásmido pJK101 expresan β -galactosidasa cuando se las crece en medio con galactosa como única fuente de carbono. (B) Si la proteína de fusión a LexA se expresa y se localiza correctamente en el núcleo, se une al operador LexA, bloqueando la transcripción mediada por Gal4 y por lo tanto la actividad β -gal.

Utilizando esta herramienta, nos dispusimos a analizar la correcta expresión de las proteínas de fusión que involucran a Sima salvaje y a sus cuatro variantes mutadas. Para tener todos los elementos necesarios expresados en una única cepa de levadura, llevamos a cabo apareamientos de dos cepas, una conteniendo la correspondiente variante de Sima (EYG42) y la otra (EYG48), de sexo opuesto, conteniendo el reportero transcripcional pJK101. Basándonos en el criterio de que la capacidad de reprimir la expresión de LacZ de todas las fusiones LexA-Sima fuesen semejantes, se eligió una cepa de cada una de las variantes de Sima (infiriendo que todas ellas expresan niveles similares de proteína (Fig. 39).

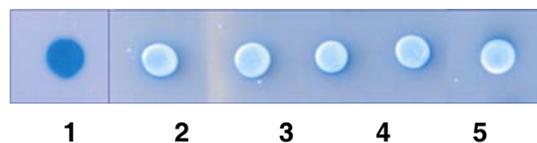


Figura 39: Las proteínas de fusión LexA-Sima se expresan, entran al núcleo y se unen al operador *lexA*. (1) Inducción constitutiva de β -galactosidasa en levaduras conteniendo sólo el plásmido pJK101 y crecidas en galactosa como fuente de carbono. La expresión de las fusiones que involucran a Sima (2), SimaF92Y (3), SimaL101A (4), SimaM115A (5) o SimaI124A (6) bloquea la transcripción dependiente de Gal_{UAS}, reprimiendo la actividad β -galactosidasa. Nótese que el nivel de represión de las transcripción en las diferentes cepas es semejante en todos los casos.

3.1.1- Las mutantes de Sima (SimaF92Y; SimaL101A; SimaM115A; y SimaI124A) interactúan correctamente con Tango.

Siguiendo una metodología reportada previamente para estudios de interacción entre Tango y otras proteínas de la familia bHLH-PAS (Ward y col., 1998), la proteína Tango completa se utilizó como “presa” en el vector pJG4-5. Por lo tanto, este plásmido fue transformado junto con el reportero transcripcional, pSH18-34, en la cepa de levaduras EYG48; posteriormente, se apareó esta última cepa con aquéllas que contenían las variantes de Sima utilizadas como carnada y se analizó la interacción entre ambas subunidades midiendo la capacidad de las proteínas de fusión de activar la transcripción a partir del operador LexA. Este sistema presenta dos elementos reporteros, uno insertado en el genoma de la cepa EYG48, donde el promotor del gen LEU2 es reemplazado por el operador LexA y otro en el plásmido pSH18-34, el cual posee el operador LexA dirigiendo la expresión de LacZ (figura 40).

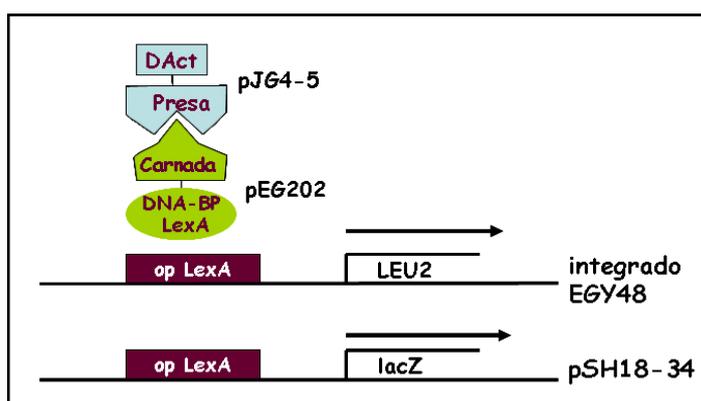


Figura 40. Sistema LexA del doble híbrido en levaduras. Este sistema presenta dos elementos reporteros, uno insertado en el genoma de la cepa EYG48, donde el promotor del gen LEU2 es reemplazado por el operador LexA y otro en el plásmido pSH18-34, el cual posee el operador LexA controlando la expresión de LacZ.

Por lo tanto, la interacción entre Tango y las distintas formas mutagenizadas de Sima pudo estimarse observando el crecimiento de las levaduras en un medio carente de leucina o midiendo la actividad β -galactosidasa. Como se muestra en la figura 41A, SimaF92Y, SimaL101A, SimaM115A y SimaI124A presentan niveles de actividad β -galactosidasa comparables a los de Sima salvaje. De manera similar, en la figura 41B se observa que el crecimiento de las levaduras en ausencia de leucina fue similar en las cepas que expresan las distintas mutantes de Sima en comparación con la proteína Sima salvaje. Estos resultados

indican que las mutaciones conservativas introducidas en el dominio bHLH de Sima no afectan la interacción física entre Sima y Tango.

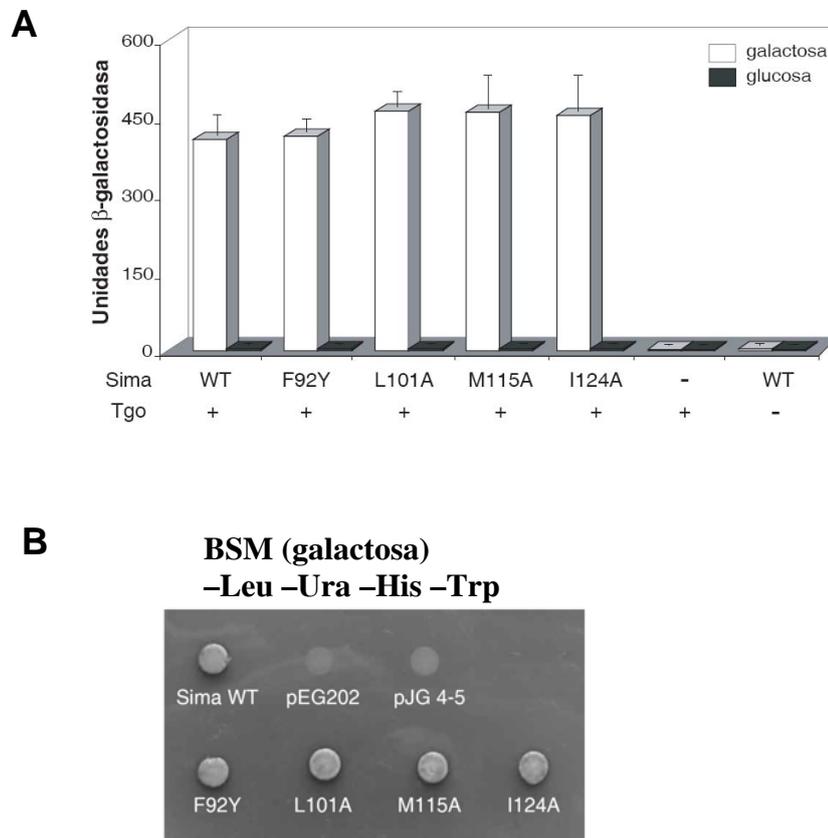


Figura 41: Las mutantes conservativas de la NES1 o la NES2 de Sima interactúan correctamente con Tango. Ensayo del doble híbrido en levaduras. (A) Se analizó la actividad β -galactosidasa de los cultivos líquidos de levaduras que contenían a Sima salvaje o a sus variantes mutagenizadas como carnada y a Tango completo como presa. Se utilizó glucosa o galactosa como fuente de carbono y se empleó el plásmido pSH18-34 LacZ como reportero. Como controles negativos de la interacción entre Sima y Tango, se utilizaron los vectores vacíos (pEG202 o pJG4-5). (B) Se analizó la capacidad de crecimiento de las mismas cepas de levaduras descritas en (A) en un medio a base de galactosa pero en ausencia de leucina. Todas las interacciones resultaron positivas; sólo las levaduras que contenían los vectores pEG202 o pJG4-5 vacíos fueron incapaces de crecer en medio sin leucina.

3.2- Análisis de las interacciones entre Tango y las variantes mutagenizadas de Sima en ensayos de co-inmunoprecipitación

Con el objeto de analizar si las variantes mutagenizadas de Sima pueden interactuar físicamente con Tango, llevamos a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación luego de co-transfectar células COS-7. Para ello, clonamos las porciones N-terminal de Sima, de

SimaL101A o de SimaM115A en el vector pcDNA6-V5-HIS, las cuales habían sido previamente fusionadas al epítotope HA en el extremo amino terminal de la proteína. La secuencia completa de Tango fue clonada en pcDNA6-V5-HIS. Los homogenatos fueron preparados a partir de células COS-7 co-transfectadas con Tango y Sima salvaje o sus variantes mutagenizadas. Células transfectadas solamente con Tango fueron utilizadas como control negativo. Los homogenatos fueron incubados con el anticuerpo anti-HA (Santa Cruz) en presencia de proteína A-sepharosa. El inmunoprecipitado fue resuelto en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y la presencia de Tango fue revelada por western blot utilizando un anticuerpo anti-Tango. En la figura 42 se observa que tanto Sima salvaje como ambas formas mutantes son capaces de interactuar con Tango, indicando que las mutantes retienen la capacidad de formar el heterodímero necesario para la transactivación de genes blanco.

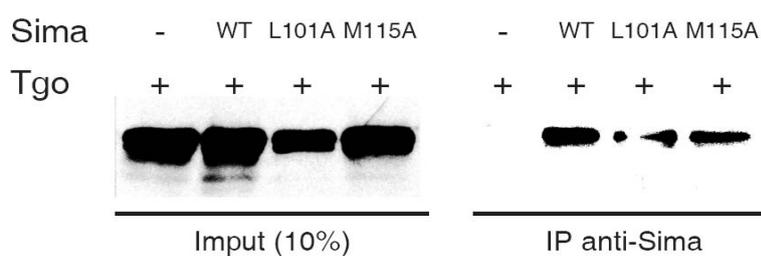


Figura 42. La interacción entre Sima y Tango se conserva en las variantes mutadas de Sima L101A y M115A. Ensayo de co-inmunoprecipitación Sima-Tango en células de mamífero (COS-7). Sima salvaje o las variantes mutagenizadas de Sima unidas a HA fueron co-transfectadas con Tango en células COS-7; los extractos fueron sometidos a inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-HA, para posteriormente ser analizados por western blot utilizando un anticuerpo anti-Tgo.

4- SimaL101A y SimaM115A tienen disminuida su capacidad de exportación

Una vez establecido que las cuatro variantes de Sima son funcionalmente activas y que interactúan específicamente con Tango, estudiamos si su exportación nuclear se encontraba afectada. Generamos líneas de moscas transgénicas que expresan las distintas variantes de Sima a niveles similares (Sima, SimaF92A, SimaI124A, SimaL101A y SimaM115A) y utilizamos el ensayo de re-oxigenación para evaluar la capacidad de estas proteínas de ser exportadas al citoplasma. Mientras que las variantes F92Y y I124A se comportaron

exactamente igual que Sima salvaje (Fig. 43A), las otras dos variantes mutagenizadas L101A y M115A mostraron una clara disminución en su velocidad de exportación (Fig. 43B). El modelado matemático del proceso de exportación permitió determinar un $T_{1/2}$ de 9 y 13 minutos respectivamente para SimaL101A y SimaM115A (Fig. 43 B).

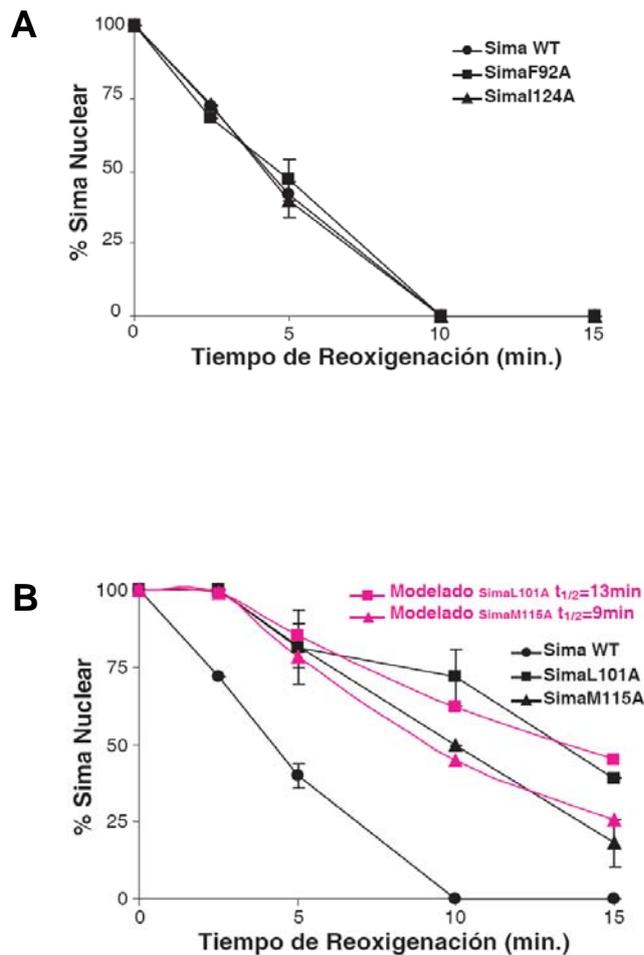


Figura 43: La velocidad de exportación de SimaL101A y SimaM115A está disminuida con respecto a Sima salvaje. Embiones transgénicos de estadio 15 expresando Sima salvaje o Sima portando mutaciones conservativas en el dominio bHLH fueron expuestos a condiciones de hipoxia (1% O_2) durante cuatro horas y posteriormente transferidos a normoxia. Se muestra la proporción de embiones que contienen a Sima localizada en el núcleo a diferentes tiempos post-reoxigenación, determinado por inmunofluorescencia anti-Sima. (A) variantes F92A y I124A; (B) variantes L101A y SimaM115A. El tiempo medio de exportación de SimaL101A y SimaM115A fue de 13 y 9 minutos respectivamente (Kaplan-Meier; $p < 10^{-4}$; $n > 30$).

5- La disminución de la exportación nuclear de Sima conduce a un incremento de su actividad transcripcional

5.1-Análisis de los niveles de expresión de SimaL101A y SimaM115A en líneas transgénicas

Dado que el objetivo final era determinar de qué manera se ve afectada la actividad transcripcional del heterodímero Sima-Tango cuando la exportación nuclear de Sima se halla impedida, era necesario determinar que las líneas transgénicas que sobre-expresaban variantes mutagenizadas de Sima con defectos de exportación tuviesen niveles de expresión similares a los de la proteína salvaje. A este fin, se generaron al menos cinco líneas transgénicas para cada una de las variantes mutagenizadas y a cada una de estas líneas se le determinaron los niveles de expresión de la proteína transgénica, tras el cruzamiento con la línea inductora en-Gal4. La cuantificación de la expresión de las variantes transgénicas de Sima se realizó por inmunofluorescencia seguida de un análisis cuantitativo en el microscopio confocal (Carl Zeiss LSM5, Pascal). Se seleccionó una línea transgénica que expresase cada una de dichas variantes, buscando que el nivel de expresión de todas ellas fuese similar (Fig. 44).

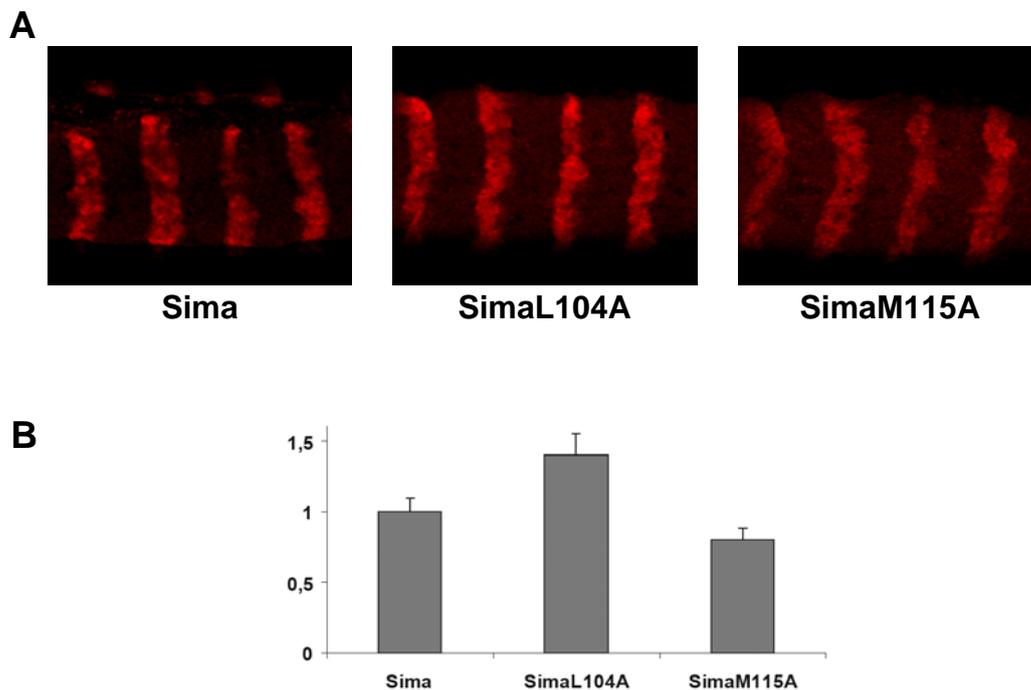


Figura 44. Cuantificación de la expresión de Sima o de variantes mutagenizadas de Sima por inmunofluorescencia en las líneas transgénicas. A) Inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Sima en embriones transgénicos para Sima salvaje o las variantes mutagenizadas de Sima; se muestran cuatro bandas de expresión de engrailed correspondientes al estadio embrionario 10. B) Se cuantificaron los niveles de expresión de las distintas variantes de Sima utilizando el software LSM Image Browser del microscopio confocal (Carl Zeiss- LSM5 Pascal).

5.2- Análisis de la expresión del reportero transcripcional LDH-LacZ

Con el objeto de analizar si la exportación nuclear de Sima contribuye a la regulación de la actividad transcripcional del heterodímero Sima-Tango, introdujimos mediante cruzamientos y recombinación un reportero transcripcional inducible por hipoxia (Lavista-Llanos y col., 2002) en las líneas transgénicas SimaL101A y SimaM115A. Este reportero transcripcional, denominado LDH-LacZ expresa el gen de la β -galactosidasa bajo el control del *enhancer* de la Lactato deshidrogenasa-A murina (ver Figura 6), de modo que tanto en condiciones de hipoxia, como tras la sobre-expresión de Sima, el reportero se induce sensiblemente. Estos embriones conteniendo el reportero y expresando las distintas variantes de Sima bajo el control de *en-Gal4* fueron crecidos en normoxia y luego fijados e incubados en presencia del sustrato cromogénico X-gal que revela la actividad β -galactosidasa. Como se observa en la figura 45A, el reportero se expresa en el típico patrón de catorce bandas coincidente con la expresión ectópica de Sima bajo el control *en-Gal4* (Sima WT). De acuerdo a lo esperado, la transcripción del reportero no se indujo en respuesta a la expresión de Sima Δ HHLH, ya que esta variante de la proteína no puede mediar la transcripción (Fig. 45A). Notablemente, los niveles de expresión de β -galactosidasa se encontraron aumentados en los embriones provenientes de las líneas transgénicas que expresan variantes de Sima con defectos de exportación (SimaL101A y SimaM115A; Fig. 45A). Estos resultados sugieren que la inhibición de la exportación nuclear de Sima provoca un aumento de los niveles de Sima en el compartimento nuclear, lo cual a su vez provoca un incremento en los niveles de los transcriptos que el heterodímero Sima-Tango induce. A fin de obtener información cuantitativa acerca de este incremento de la expresión del reportero, realizamos homogenatos de los embriones y cuantificamos la actividad β -galactosidasa mediante un ensayo colorimétrico utilizando Rojo de Clorofenol β -D-galactopiranosido (CPRG) como sustrato. Como se muestra en la figura Fig. 45B, los embriones expresando SimaL101A y SimaM115A mostraron un aumento en la actividad β -galactosidasa dos y tres veces respectivamente, en comparación con la actividad de los embriones que expresan Sima salvaje. Estos resultados confirman que al interferir con la exportación nuclear de Sima se incrementa la actividad transcripcional del heterodímero, Sima-Tango. Estos resultados cobran aun más significancia si tomamos en consideración que en cultivos celulares, en condiciones de activación máxima de la vía (por agregado de DFO), la actividad transcripcional intrínseca de las variantes mutagenizadas, SimaL101A y SimaM115A, fue aproximadamente 40% menor que la actividad transcripcional de Sima salvaje (Fig. 37). Concluimos por lo tanto, que las variantes de Sima cuya exportación nuclear está comprometida, permanecen más tiempo en el núcleo, transactivando genes blancos con mayor eficiencia.

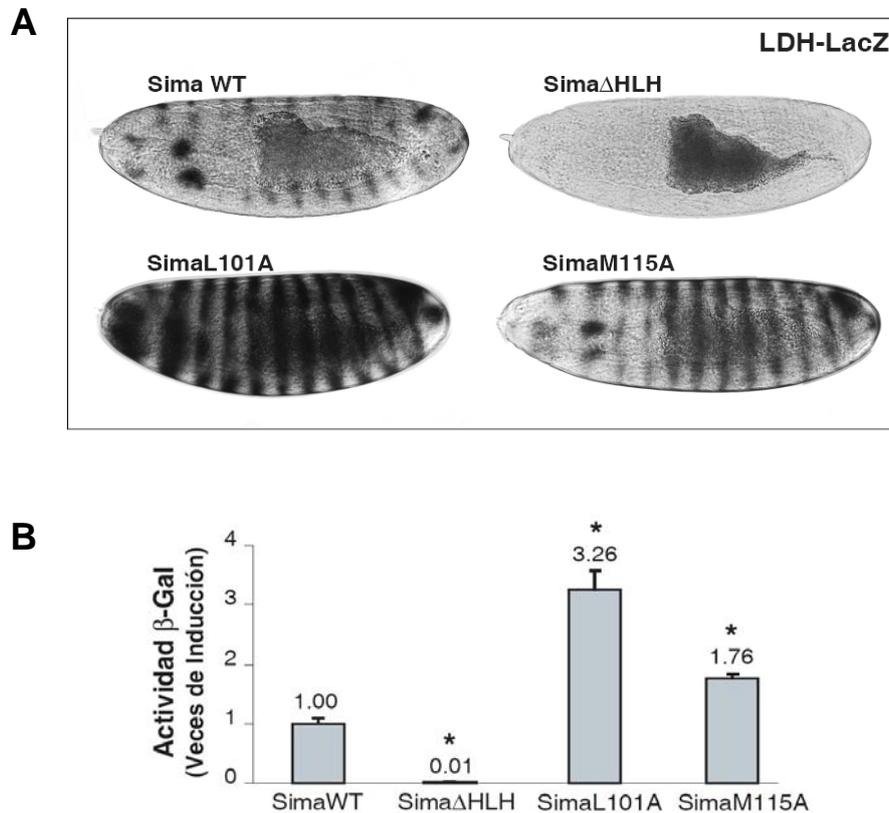


Figura 45: Las variantes de Sima con mutaciones en la NES1 o la NES2 tienen aumentada su actividad transcripcional. (A) El reportero transcripcional inducible por Sima (LDH-LacZ) se cruzó con las líneas transgénicas que expresan Sima salvaje o variantes mutadas de Sima y luego se analizó la expresión del reportero en ensayos de X-gal en normoxia. (B) Se cuantificó la actividad β -galactosidasa de estos embriones utilizando CPRG como sustrato. Los resultados se analizaron mediante el test T-student (*: $p < 10^{-3}$; $n=3$).

5.3- Transactivación de genes endógenos

Para validar los resultados obtenidos con el reportero LDH-LacZ con un gen blanco endógeno, analizamos por hibridización *in situ*, la expresión del gen *fatiga*, previamente descrito como gen blanco de Sima (Lavista-Llanos y col., 2002). Como se observa en la figura 46, la expresión del gen *fatiga* se ve aumentada en las bandas donde se expresa Sima salvaje, mientras que en la región de interbanda se observa solamente la expresión endógena del mensajero.

Consistentemente con los resultados obtenidos con el reportero LDH-LacZ, *fatiga* no se indujo tras la expresión de Sima Δ HLH, la variante de Sima sin actividad transcripcional, (Fig.

46). Las variantes de Sima con la exportación nuclear afectada, SimaL101A y SimaM115A, indujeron la expresión de *fatiga* con mayor intensidad que Sima salvaje (Fig. 46). Estos resultados junto a los descriptos mas arriba, muestran *in vivo* que la exportación nuclear de Sima contribuye a la regulación de la actividad transcripcional de la proteína.

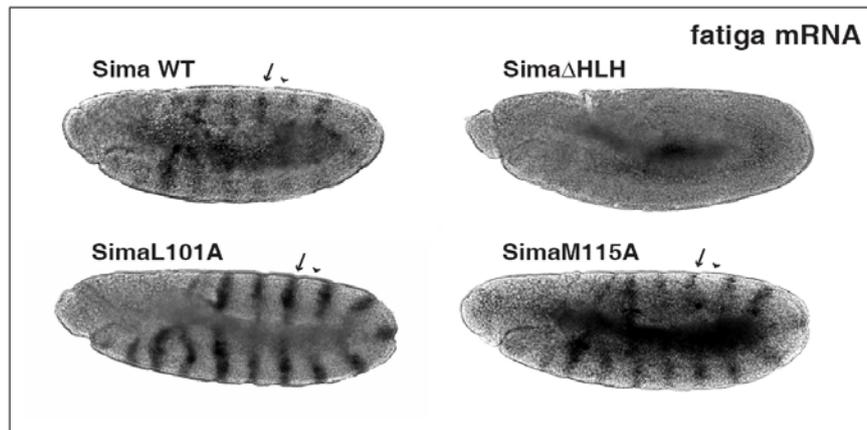


Figura 46: Mutaciones de Sima que afectan su exportación Nuclear (SimaL101A y SimaM115A) aumentan los niveles de expresión de *fatiga*, un gen blanco de Sima. Se analizó la expresión del gen *fatiga* por hibridación *in situ* de mRNA en embriones que expresan las distintas variantes de Sima bajo el control del inductor enGal4. Nótese que Sima Δ HLH, que es transcripcionalmente inactiva, no induce la expresión de *fatiga* y que las variantes cuya exportación nuclear está afectada, SimaL101A y SimaM115A muestran niveles incrementados de *fatiga*. Las flechas señalan una de las 14 bandas en las que *fatiga* está sobre-expresada, mientras que la cabeza de flecha muestra una de las regiones de interbanda.

III- EFECTO DE TANGO SOBRE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE SIMA

El estado de dimerización de una proteína es crucial para determinar su localización subcelular. De hecho, Tracheiless y Singled-minded, otras dos proteínas de *Drosophila* pertenecientes a la familia bHLH-PAS que interactúan con Tango, necesitan de la presencia de Tango para localizarse en el núcleo (Ward y col., 1998). Se demostró en células S2 que tanto Tracheiless como Singled-minded se localizan en el citoplasma en ausencia de Tango, mientras que en presencia de Tango ambas proteínas se encuentran en el núcleo (Ward y col., 1998). El mecanismo molecular por el que Tango regula la localización de estas proteínas bHLH-PAS no se conoce; a priori, Tango podría regular positivamente su entrada al núcleo o inhibir su exportación al citoplasma.

En este contexto, nos preguntamos si Tango influye sobre la localización subcelular de Sima. Como se mostró mas arriba, el dominio bHLH de Sima no sólo participa en la interacción con Tango, sino que además contiene las NES reconocidas por CRM1, abriendo la posibilidad de que Tango y CRM1 compitan por el sitio de unión a Sima. Si esto fuera cierto, se esperaría que los niveles de Tango tengan influencia sobre la exportación de Sima al citoplasma. Se analizó por lo tanto, si alterando los niveles de Tango se modifica la localización subcelular de Sima y posteriormente, se realizaron experimentos de reoxigenación para determinar si se modifica la velocidad de su exportación nuclear.

1- El aumento de los niveles de Tango no altera la localización de Sima, ni su cinética de exportación.

Dado que desconocemos si los niveles de Tango son limitantes en nuestro sistema experimental, decidimos sobre-expresar también a Tango junto con Sima y analizar si en estas condiciones la localización subcelular de Sima se modifica. Si los niveles de Tango fuesen limitantes y dichos niveles fueran determinantes para la localización subcelular de Sima, esperaríamos ver una diferencia.

Inicialmente, era necesario verificar que la sobre-expresión de Tango en la línea transgénica funcionase, para lo cual utilizamos ensayos de Western Blot. Como se observa en la figura 47, la sobre-expresión de Tango, efectivamente provoca un aumento en los niveles de la proteína.

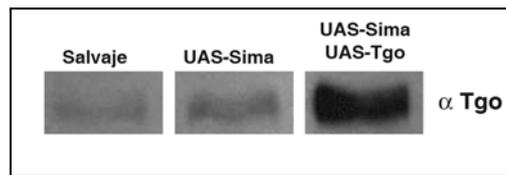


Figura 47. Los niveles de Tango aumentan al sobre-expresarlo en embriones de la línea UAS-Tango. Extractos de embriones expresando Sima o Sima junto con Tango (*UAS-Sima* o *UAS-Tango.UAS-Sima*) fueron analizados por western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Tgo. Nótese el claro aumento en los niveles de Tango en la línea que lo sobre-expresa.

1.2- La sobre-expresión de Tango no modifica la localización subcelular de Sima en el equilibrio

Con el fin de evaluar un posible efecto de Tango sobre la localización subcelular de Sima, expresamos ambas proteínas bajo el control de la línea inductora en-Gal4. En la figura 48 se observa que la sobre-expresión de Tango no modifica la localización subcelular de Sima ni en normoxia (21% O₂) ni en hipoxia (1% O₂). Esto podría deberse a que los niveles de Tango endógenos son suficientes para asociarse con la proteína Sima sobreexpresada o bien, a que Tango no participa en la regulación de la localización subcelular de Sima.

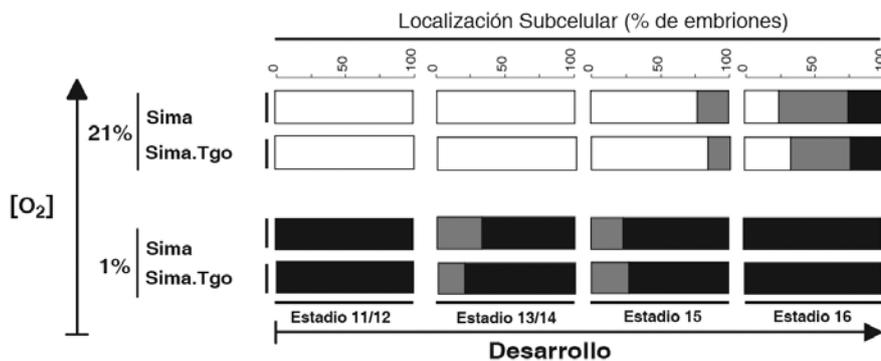


Figura 48. La localización de Sima no se modifica por la presencia de altos niveles de Tango. Análisis cuantitativo de la localización subcelular de Sima en embriones transgénicos que expresan solamente Sima, en comparación con embriones que expresan simultáneamente Sima y Tango. Color blanco: localización citoplasmática; color gris: localización ubicua; color negro: localización nuclear. Nótese que la sobre-expresión de Tango no altera la localización subcelular de Sima.

Para continuamos analizando un posible efecto de Tango sobre la exportación de Sima, analizamos en ensayos de reoxigenación si la cinéticas de exportación de Sima se encuentra

alterada en embriones que sobre-expresan Tango. En la figura 49 se muestra que la cinética de exportación de Sima no se encuentra alterada en estos embriones, sugiriendo que Tango no competiría con CRM1 por la unión al dominio bHLH.

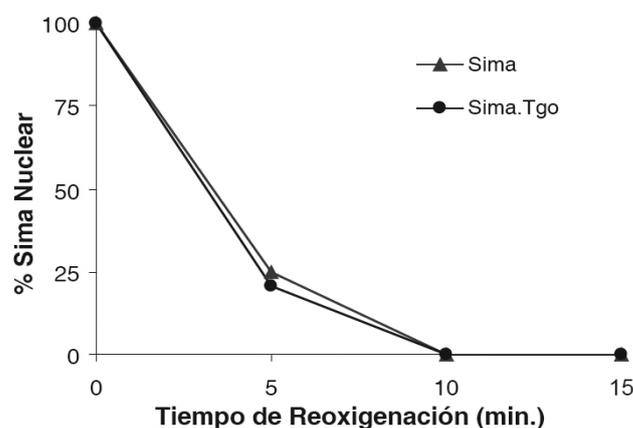


Figura 49. La cinética de exportación de Sima no se modifica por altos niveles de Tango. Los embriones expuestos a 1% O₂ durante cuatro horas fueron transferidos a normoxia y fijados a distintos tiempos luego de la reoxigenación. Por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-Sima, se terminó la proporción de embriones clasificada como “nucleares” en cada uno de los puntos. Nótese que la cinética de exportación de Sima en los embriones que sobre-expresan Tango no se encuentra alterada.

2- Ni la localización subcelular de Sima ni su cinética de exportación nuclear se modifican en el mutante Tgo^{PY}.

Para continuar analizando si Tango participa en la regulación de la localización subcelular de Sima, estudiamos un posible efecto de la ausencia de Tango. Debido a la falta de mutantes nulos que hayan sido caracterizados, utilizamos un nuevo mutante llamado Tgo^{PY} que fue generado en el laboratorio de Hugo Bellen en el proyecto de disrupción génica sistemática BDGP.

2.1- Caracterización del mutante Tgo^{PY}

El gen *tango* se encuentra en el tercer cromosoma de *Drosophila* y genera un único transcrito formado por dos exones de 140 y 2965 pares de bases y un pequeño intrón de 143 pares de bases. La línea Tgo^{PY} tiene inserto un elemento P transponible de aproximadamente 11 kb en el primer intrón (Fig. 50A). Esta inserción aumentaría considerablemente el tamaño

del transcripto primario comprometiendo posiblemente la eficiencia de traducción de la proteína.

Este mutante es letal recesivo en larva I, posiblemente debido a que estas larvas mutantes homocigotas eclosionan completamente sin tráqueas debido a la pérdida de función del heterodímero Trachealess-Tango (Fig. 50B). Esto confirma que los niveles de Tango en el mutante Tgo^{PY} se encuentran drásticamente disminuidos.

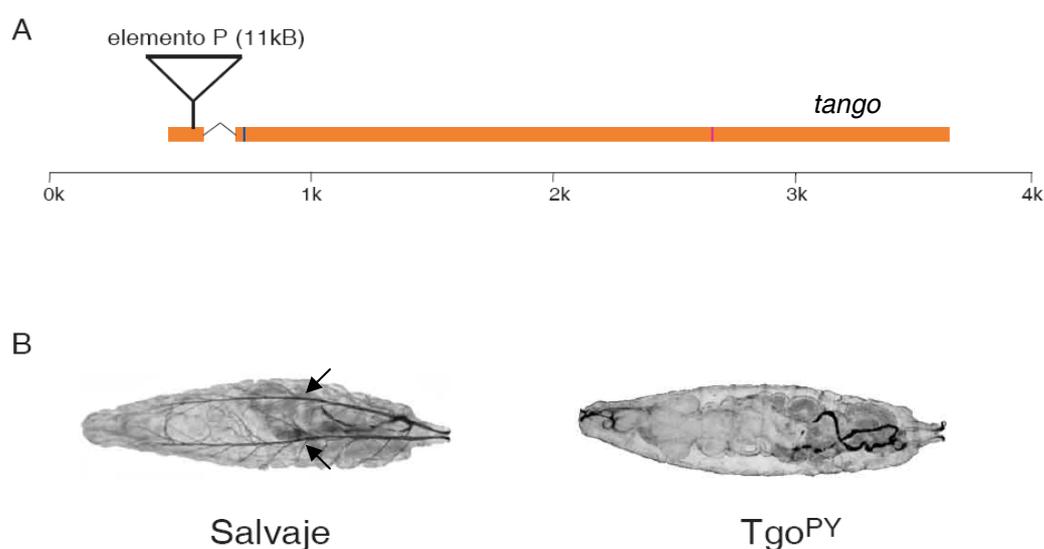


Figura 50. Los mutantes homocigotas Tgo^{PY} presentan defectos en la formación de las tráqueas y letalidad en larva 1. A) Esquema de la inserción del elemento P en el primer exón del gen *tango*. B) Larvas de 1° estadio de la cepa salvaje y del mutante Tgo^{PY} : se observa la falta total de traqueas en la larva mutante. Las flechas señalan los dos principales troncos traqueales de la larva salvaje.

2.2- La localización subcelular de Sima no se modifica en el mutante Tgo^{PY}

Para analizar un posible efecto de la ausencia de Tango sobre la localización subcelular de Sima, generamos embriones con el genotipo $enG4.Tgo^{PY}/UAS-Sima.Tgo^{PY}$, en los cuales la mutación Tgo^{PY} fue recombinada en el 3er cromosoma con los elementos Gal4 y UAS-Sima. En la figura 51 se observa que la localización subcelular de Sima no se encuentra alterada en los embriones mutantes, sugiriendo que los niveles de Tango no son críticos para la correcta localización subcelular de la proteína.

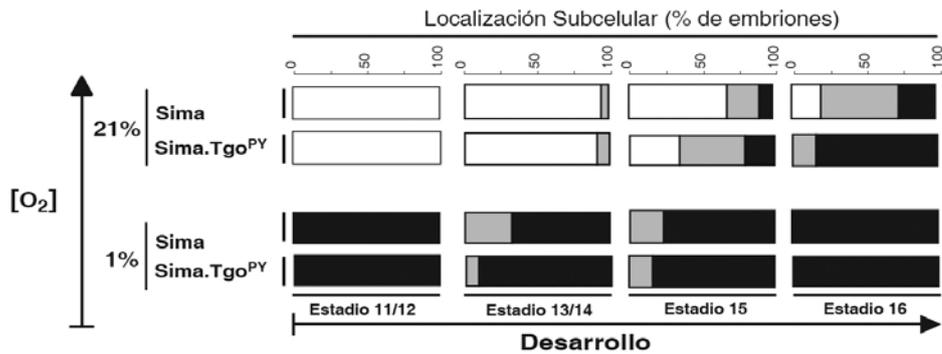


Figura 51. Los embriones del mutante Tgo^{PY} presentan la misma localización subcelular de Sima que los embriones salvajes. Análisis cuantitativo de la localización subcelular de Sima en embriones mutantes para Tango y transgénicos para Sima ($en-Gal4.Tgo^{PY}/UAS-Sima.Tgo^{PY}$) a diferentes concentraciones de oxígeno a lo largo de la embriogénesis. Color blanco: localización citoplasmática; color gris: localización ubicua; color negro: localización nuclear. Nótese que la pérdida de función de Tango no influye sobre la localización de Sima.

2.3- Sima se exporta con la misma cinética en el mutante Tgo^{PY}

Para evaluar una posible participación de Tango en la exportación nuclear de Sima, analizamos el efecto de la pérdida de función de Tango directamente en ensayos de reoxigenación en los embriones $enG4.Tgo^{PY}/UAS-Sima.Tgo^{PY}$. Como se observa en la figura 52, la cinética de exportación de Sima no se vio alterada en estos mutantes. Estos resultados, tomados en conjunto con los de sobre-expresión de Tango (sección 1) sugieren que los niveles de Tango no influirían sobre el proceso de exportación nuclear de Sima.

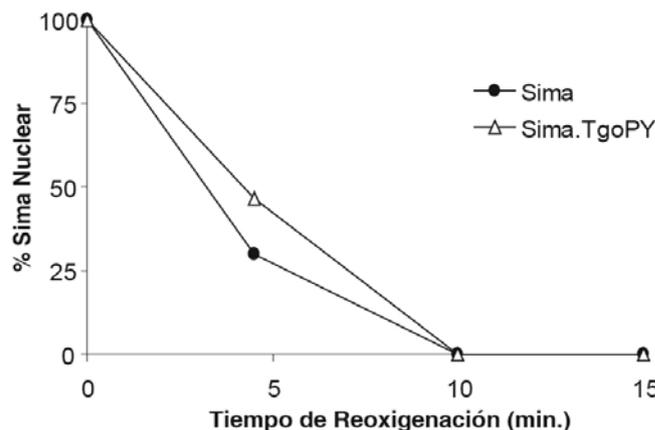


Figura 52. La exportación nuclear de Sima no se altera en el mutante Tgo^{PY} . Embriones con el genotipo $enG4.Tgo^{PY}/UAS-Sima.Tgo^{PY}$ fueron expuestos a 1% O₂ durante cuatro horas, luego transferidos a normoxia y fijados a distintos tiempos después de la reoxigenación. Por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Sima se terminó la proporción de embriones clasificados como “nucleares” en cada punto. La cinética de exportación de Sima no se encuentra alterada en los mutantes Tgo^{PY} .

IV- REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA HIF α HUMANA

Como se mencionó más arriba, la localización subcelular de la proteína HIF α de mamíferos está regulada por niveles de oxígeno (Kallio y col., 1998). En normoxia, HIF1 α se localiza en el citoplasma mientras que en hipoxia se encuentra en el núcleo. La entrada al núcleo depende de una NLS que mapea en la porción C-terminal de la proteína (Luo y Shibuya, 2001). Esta NLS es reconocida por la importina- α que junto con la importina- β permiten la traslocación de HIF1 α al núcleo (Depping y col., 2008). Si bien, no ha sido aún dilucidado un posible mecanismo de exportación nuclear de HIF1 α , se ha descrito que tras la reoxigenación de cultivos de células de mamíferos, HIF1 α es exportado mediante un mecanismo que al menos en parte, depende de VHL (Groulx y Lee, 2002). Hasta el momento, no se han identificado ni exportinas ni señales de exportación nuclear involucradas en la exportación de HIF α o VHL.

1- HIF1- α tiene dos motivos de unión a CRM1 en su dominio bHLH y HIF2 α tiene uno solo.

Debido a la alta similitud de los mecanismos de regulación descritos hasta el momento en Sima y en HIF-1 α , decidimos evaluar la posibilidad de que HIF-1 α también sea exportado del núcleo de manera dependiente de CRM1. Como se mencionó mas arriba, las señales de exportación del dominio bHLH de Sima, NES1 y NES2, se encuentran evolutivamente conservadas en las subunidades HIF-1 α de un amplio rango de grupos filogenéticos (Fig. 53), sugiriendo que estas NES podrían ser importantes en la regulación de HIF-1 α . Llamativamente, en HIF-2 α se encuentra conservada la NES1 pero no la NES2 (Fig. 53).

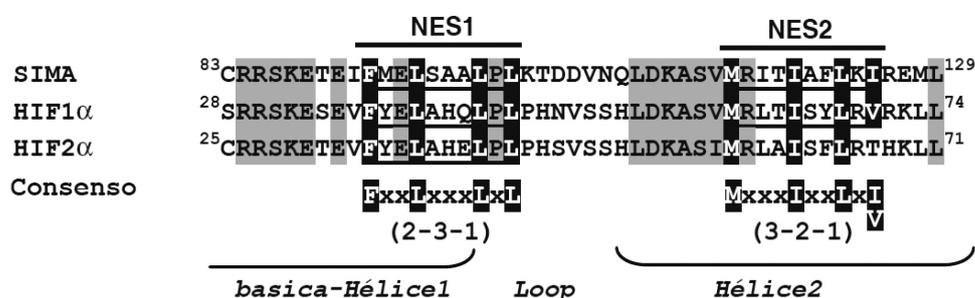


Figura 53. Las señales de exportación de Sima NES1 y NES2 están conservadas en HIF1 α de mamíferos pero sólo la NES1 está presente en HIF2 α . Alineamiento de los dominios bHLH de proteínas HIF- α humanas y Sima de *Drosophila*. Las secuencias consenso para la NES1 y la NES2 están marcadas en negro y otros residuos conservados dentro del dominio bHLH están marcados en gris. Los números entre paréntesis denotan el tipo de secuencia consenso de cada una de las NES.

2- Capacidad del motivo HLH de HIF-1 α y HIF-2 α humanos de dirigir la exportación nuclear de EGFP en células S2.

Para examinar si las NESs del dominio bHLH de HIF-1 α humano podrían ser funcionales, comenzamos por evaluar la capacidad del motivo HLH de dirigir la exportación nuclear de un reportero EGFP de manera autónoma. Para ello, fusionamos el motivo HLH de HIF-1 α (aminoácidos 22 a 71) o de HIF-2 α (aminoácidos 19 a 68) a EGFP (EGFP-HIF1 α HLH y EGFP-HIF2 α HLH), luego de lo cual transfectamos las construcciones en células S2 de *Drosophila* y estudiamos la localización subcelular de las quimeras por microscopía confocal (Carl Zeiss LSM5, Pascal) siguiendo la metodología descrita más arriba. Utilizando el software LSM Image Browser, medimos la intensidad promedio de la fluorescencia correspondiente a EGFP en el núcleo y en el citoplasma y calculamos la relación de intensidades de fluorescencia entre ambos compartimentos (relación núcleo: citoplasma; N/C). Se cuantificó un número mínimo de 13 células para cada condición y se analizó la significancia de los resultados mediante el test T-student. Una vez establecida la relación N/C para EGFP (1,4) procedimos a analizar las relaciones N/C para EGFP-HIF1 α HLH y EGFP-HIF2 α HLH. Como muestra la figura 54, ambas quimeras resultaron mayormente excluidas del compartimento nuclear, exhibiendo una distribución subcelular similar a la observada para EGFP-SimaHLH, con una relación N/C de 0.80 y 0.95 respectivamente (Fig. 54 E). Tras el agregado de LMB, la localización de EGFP-HIF1 α HLH y EGFP-HIF2 α HLH se tornó

marcadamente más nuclear, exhibiendo una relación N/C de 1.2 en ambos casos (Fig. 54). Estos resultados indican que, tanto el dominio bHLH de HIF-1 α , como el de HIF-2 α poseen señales de exportación nuclear dependientes de CRM1 que son funcionales incluso cuando se encuentran aisladas de su entorno normal en la proteína completa.

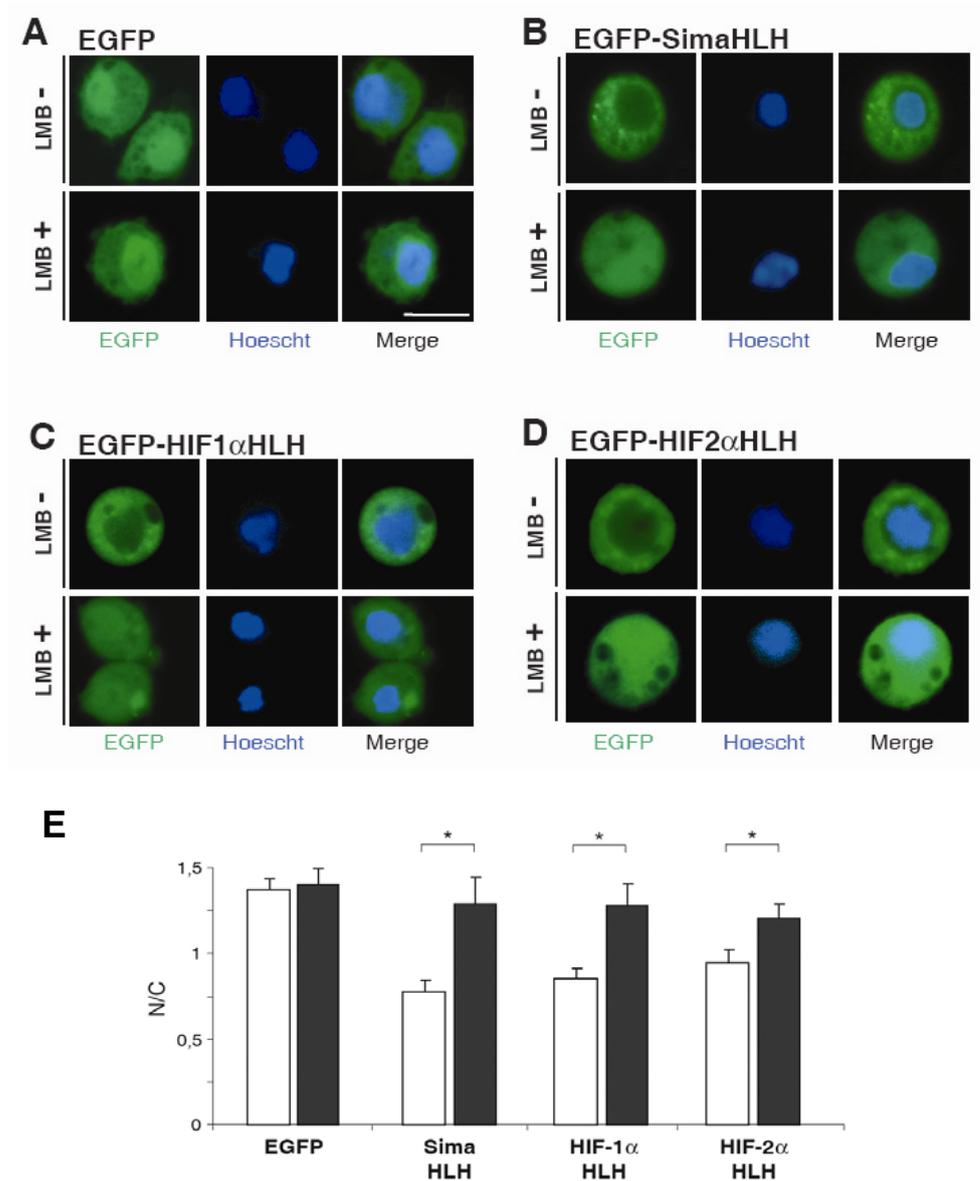


Figura 54. El motivo HLH de HIF-1 α y de HIF-2 α es capaz de promover la exportación nuclear del reportero EGFP. (A-D) Se transfectoron en células S2 diferentes quimeras en las que los motivos HLH de HIF-1 α , HIF-2 α y Sima (control) fueron fusionadas a EGFP; las células fueron tratadas o no con LMB seis horas después de inducir la expresión con CuSO₄. La localización subcelular se analizó por microscopía confocal (Barra de escala: 10 μ m). (E) En el gráfico se representa la relación N/C de cada construcción. Nótese que la localización de la fusión EGFP-HIF1 α HLH y EGFP-HIF2 α HLH es sensible a LMB al igual que el control EGFP-SimaHLH (Student t test; *: $p < 10^{-4}$; $n > 10$).

3- La localización subcelular del HIF1 α humano depende de CRM1.

3.1- Sensibilidad a LMB de la localización de HIF1 α humano

Con el objeto de analizar si la localización subcelular del HIF-1 α humano depende de CRM1, analizamos de qué manera varía la localización de una quimera involucrando la secuencia completa de HIF-1 α (EGFP-HIF1 α), transfectada en células humanas de osteosarcoma, U2OS, tras el agregado de LMB. Las células fueron transfectadas de manera transiente utilizando el reactivo transit-LT1 (Mirus) y se analizó la localización subcelular bajo el microscopio de fluorescencia (Axiovert 135 M – Zeiss). A diferencia de la localización de las fusiones de EGFP a secuencias aminoacídicas cortas donde todas las células individuales del cultivo se comportan de manera uniforme (ver por ej, Fig. 49), EGFP-HIF1 α presentó un patrón de distribución de su localización en la población celular, similar al que había sido descrito previamente en células COS7 (Kallio y col., 1998). Definimos por lo tanto, dos categorías de localización subcelular para poder cuantificar la localización de la quimera en distintas condiciones experimentales: Categoría “Nuclear” y Categoría “No Nuclear” (Fig. 55). Como se observa en la figura 55, en normoxia EGFP-HIF1 α se localiza en el núcleo (“Nuclear”) en sólo el 40% de las células, mientras que tras el agregado de DFO, reactivo que simula una condición de hipoxia, la población celular exhibió localización “Nuclear” aumentó hasta el 65%. Esto sugiere que la localización de HIF-1 α es dependiente de oxígeno en este modelo celular.

A continuación, procedimos a estudiar si la localización subcelular de EGFP-HIF1 α se altera también tras el agregado de LMB. La figura 55 muestra que el tratamiento con LMB efectivamente altera la distribución de la localización subcelular de EGFP-HIF1 α en cultivos mantenidos en normoxia, observándose un 65% de células clasificadas como “Nucleares”.

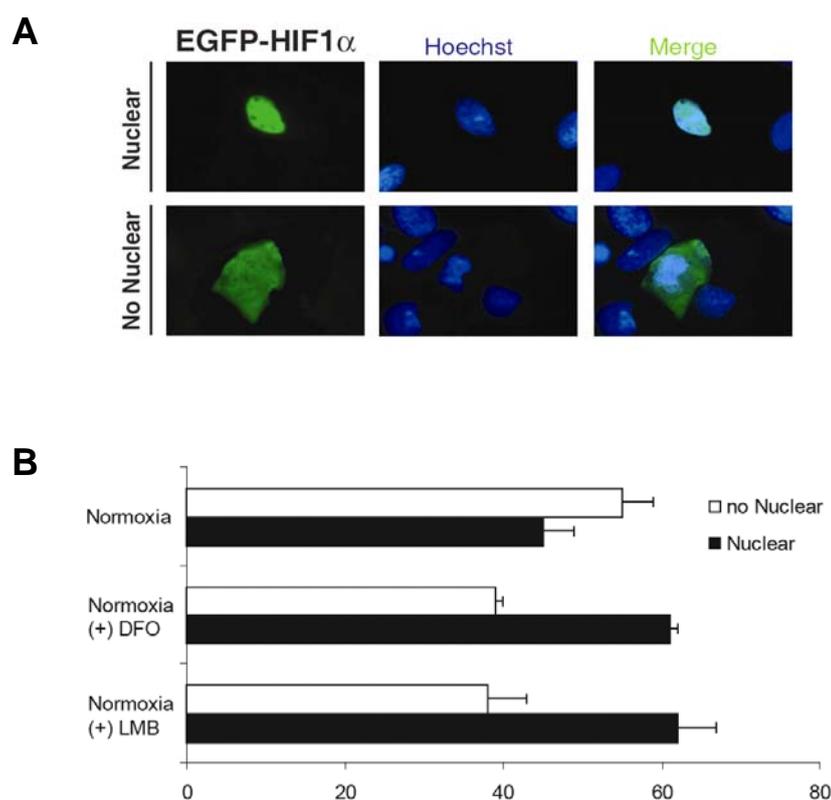


Figura 55. **HIF1 α humano presenta sensibilidad a LMB.** A) Distribución de la localización subcelular de EGFP-HIF1 α en células U2OS: Se definieron de 2 categorías: “Nuclear” y “No Nuclear”, que permiten cuantificar los resultados. B) Distribución de la localización subcelular de EGFP-HIF1 α en normoxia (21% O₂) con o sin el agregado de DFO o LMB. La proporción de células clasificadas como “nucleares” aumenta tras el agregado de DFO o LMB.

3.2- La NES1 y la NES2 del dominio bHLH de HIF1 α son responsables de su sensibilidad a LMB.

Para determinar si las NESs del dominio bHLH del HIF1 α humano median su sensibilidad a LMB, mutagenizamos de manera simultánea dos de los cuatro aminoácidos hidrofóbicos que definen la NES1 y la NES2 (EGFP-HIF1 α NES12mut) y analizamos la localización subcelular de la quimera. EGFP-HIF1 α NES12mut presentó una distribución más nuclear que EGFP-HIF1 α y asimismo, perdió la sensibilidad a LMB (Fig. 56). Estos resultados sugieren que HIF1 α podría estar regulado al menos en parte por CRM1.

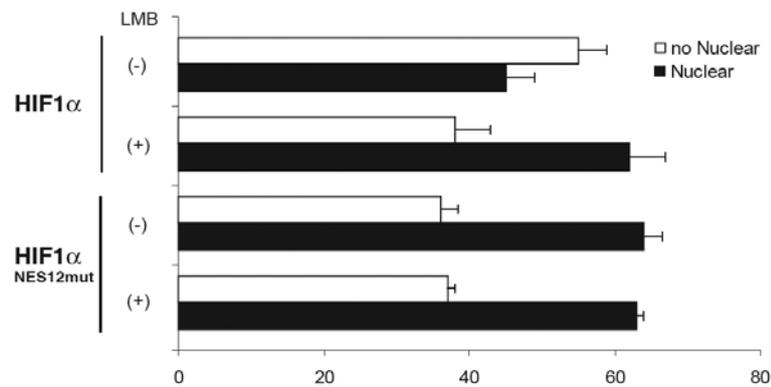


Figura 56. La sensibilidad a LMB de HIF1 α humano depende de la/s NESs del dominio bHLH. La mutación de los aminoácidos hidrofóbicos que definen la NES1 y la NES2 del dominio bHLH de HIF-1 α humano provoca un cambio en la localización subcelular de la proteína, la cual adopta una distribución más nuclear y pierde sensibilidad a LMB.

V- CONSERVACIÓN EVOLUTIVA DE LA NES1 Y LA NES2 DENTRO DE LA FAMILIA bHLH-PAS.

1-Alineamiento de Secuencias

Una vez establecida la presencia de dos señales de exportación (NES1 y NES2) en los dominios bHLH de Sima y HIF-1 α de distintos grupos filogenéticos, nos preguntamos si estas NES están presentes en otras proteínas de la familia bHLH-PAS. El alineamiento de secuencias reveló la existencia de señales de exportación nuclear homólogas a la NES1 y la NES2 de Sima en el dominio bHLH de otras proteínas de esta familia tanto en *Drosophila* como en mamíferos (Fig. 57). Como se observa en la figura 57, Sima, Trachealess y HIF-1 α presentan un alineamiento perfecto de los aminoácidos hidrofóbicos de las dos NESs, mientras que Cycle, si bien exhibe las dos NESs dentro del motivo HLH, la NES2 está desplazada hacia el extremo N-terminal. Lo mismo ocurre en el caso de la proteína humana AHR, donde la NES2 también se encuentra corrida hacia el N-terminal del dominio bHLH. Se ha reportado que estas dos NES de AHR son funcionales y necesarias para la correcta regulación de la proteína en respuesta a compuestos xenobióticos (Ikuta y col., 2002; Pollenz y Barbour, 2000). Como se mencionó para el caso de HIF-2 α , también ocurre que algunas proteínas de la familia bHLH-PAS poseen sólo una de las dos señales de exportación nuclear; ese es el caso, tanto de las proteínas Dysfusion y Singled-minded de *Drosophila*, como de la proteína β -MAL humana. Finalmente, existe un tercer grupo de proteínas de esta familia que no poseen ninguna de las dos señales de exportación nuclear; ese es el caso de las proteínas Tango y Clock de *Drosophila* y de sus proteínas homólogas en mamíferos HIF β /Arnt y Clock respectivamente. Es decir, las NESs no están presentes en Tango/ HIF β pero sí en todas las subunidades α con las que Tango/ HIF β dimeriza (Sima, Trachealess, Dysfusion, y Singled-minded en el caso de *Drosophila*) y lo mismo ocurre con Clock que no posee las NESs pero éstas sí están presentes en la subunidad Cycle con la que Clock forma el heterodímero. Por lo tanto, parece ser paradigmático que las NES del motivo HLH se encuentran presentes sólo en una de las dos subunidades del heterodímero que conforman los factores de transcripción de la familia bHLH-PAS. La presencia de estas secuencias consenso para la exportación en muchas de las proteínas de la familia sugeriría que la exportación nuclear podría ser una estrategia regulatoria general dentro de los miembros de esta familia de proteínas.

<i>Drosophila melanogaster</i>		NES1	NES2
Sima*	83	CRRSKETEI F MEL S AA P IKTDDVNQLDKASV M RIT I AFL K IR ¹²⁵	
Trachealess*	88	SRRGKENY E FYEL A KM P LPAAITSQLDKAS I IRLT I SYL K LR ¹³⁰	
Dysfusion	127	MRRDLINAE I AN I RD L P L PQSTRQRLS Q LQ L MA L V C VY R KA ¹⁶⁹	
Single-minded	11	TRREKENTE F CEL A KL P LPAAITSQLDKAS V IRLT T SYL K MR ⁵³	
Tango	24	RRRNKMTAY I TEL S DM V PTCSALARK P DKLT I LRMA V AH M KAL ⁶⁶	
Cycle*	41	RRRDKMNTY I DEL S SM P MC F AM Q RK D KL T VLRMA V QH L RGI ⁸³	
Clock	26	KRRDQFN S L V DD I S A L T ST . SS . RKMDK S T V L K ST I AFL K NH ⁶⁵	
<i>Homo sapiens</i>		NES1	NES2
HIF1*	28	SRRSKESE V FYEL A HQ T P L PHNVSSHLDKAS V MRL T ISY L LR V R ⁷⁰	
AHR*	38	RHRDRLN T ELDR I AS L T P FPQ D V I N K L D KL S V L R L S V SY L RA K ⁸⁰	
SIM1	11	TRREKENSE F YEL A KL P LP S AIT S QLDKAS I IRLT T SYL K MR ⁵³	
ARNT1	100	RRRNKMTAY I TEL S DM V PTCSALARK P DKLT I LRMA V SH M KSL ¹⁴²	
BMAL1	83	RRRDKM N S F IDEL S IV P T C NA M SR K D K L T VLRMA V QH M KTL ¹²⁵	
CLOCK	45	KRRDQFN V L K EL G SM P PG . NA . RKMDK S T V L Q KS I D F LR K H ⁸⁴	

Figura 57: Las señales de exportación nuclear NES1 y NES2 se encuentran también en otras proteínas de la familia bHLH-PAS. Alineamiento de secuencias del dominio bHLH de varias proteínas de *Drosophila* o humanas. Los residuos hidrofóbicos importantes en el reconocimiento de CRM1 a su proteína cargo está marcados en gris. La NES2 en algunos casos se encuentra desplazada dentro de la segunda hélice.

2- Evidencias de la funcionalidad de las NES predichas en el motivo HLH de otras proteínas de la familia bHLH-PAS

Dado que la fusión a EGFP del motivo HLH de Sima (EGFP-SimaHLH) demostró ser activamente exportada del núcleo de manera dependiente de CRM1, decidimos utilizar una estrategia parecida para estudiar los dominios HLH de las nuevas proteínas candidatas. Se fusionaron a EGFP en el vector pMT los motivos HLH de Trachealess (aminoácidos 78 a 131), Dysfusion (aminoácidos 120 a 172), Singled-minded (aminoácidos 5 a 58), Tango (aminoácidos 35-78), Cycle (aminoácidos 34-85), y Clock (aminoácidos 23 a 73) y las quimeras fueron transfectadas en células S2 como se describió mas arriba. La localización subcelular resultante fue analizada en el microscopio confocal (Carl Zeiss LSM5, Pascal), utilizando el software LSM Image Browser. Medimos la intensidad promedio de la fluorescencia correspondiente a EGFP en el núcleo y en el citoplasma de las células y calculamos la relación de intensidades entre ambos compartimentos (relación Núcleo: Citoplasma; N/C), como se detalló en experimentos anteriores. Se cuantificó un número mínimo de 13 células para cada condición y

se determinó el nivel de significancia de los resultados utilizando el test T-student. Como se muestra en la figura 58, la localización subcelular de las quimeras EGFP-HLH correspondientes a Tracheless (Trh) y Cycle, al igual que la correspondiente a Sima, mostraron una localización preferentemente citoplasmática con una relación N/C de 0.8 en los 3 casos. La quimera correspondiente a Tango, la cual no posee NES candidatas, mostró una localización mucho más nuclear, con una relación N/C de 1.5, similar a la relación N/C de la proteína EGFP control (N/C=1.4) (Fig. 58). Tras exponerlas a LMB, las quimeras EGFP-TrhHLH y EGFP-CycleHLH sufrieron el mismo cambio de localización subcelular que el observado para EGFP-SimaHLH. Se registró una distribución marcadamente más nuclear que en las células control, observándose una relación N/C de 1.3 y 1.2 para Trh y Cycle respectivamente, la cual resultó muy parecida al del control negativo EGFP (N/C=1.4). La localización subcelular de EGFP-TangoHLH no se vio afectada por la presencia de LMB, manteniendo una relación N/C de 1.5 (Fig. 58). La quimera correspondiente a Clock, que al igual que Tgo no posee NES candidatas, presentó una localización subcelular más citoplasmática que la del control EGFP (N/C= 0.9). Este cociente no se alteró tras el agregado de LMB (N/C=1.0). Tomados en conjunto, este bloque de resultados sugiere que una amplia gama de proteínas de la familia bHLH-PAS de *Drosophila* podrían estar reguladas a nivel de la exportación nuclear mediada por CRM1.

Como se mencionó más arriba, el alineamiento de secuencias de los dominios bHLH de las distintas proteínas de la familia sugiere que algunas de ellas presentan una de las NES candidatas pero no ambas. Para evaluar si en los casos en que existen NES únicas, estas NES podrían también ser funcionales, utilizamos la misma estrategia fusionando los motivos HLH a EGFP. Dentro de este grupo, analizamos las proteínas Dysfusion y Single-minded de *Drosophila*. Tanto EGFP-DysHLH como EGFP-SimHLH mostraron una localización preponderantemente citoplasmática con una relación N/C de 0.9. El agregado de LMB tornó a más nucleares a ambas proteínas, dando lugar a relaciones N/C de entre 1.3 y 1.5 (Fig. 58). Estos resultados muestran que las señales de exportación únicas que están presentes en el dominio bHLH de un subgrupo de proteínas bHLH-PAS podrían también ser funcionales, ampliando el número de proteínas potencialmente regulables por CRM1.

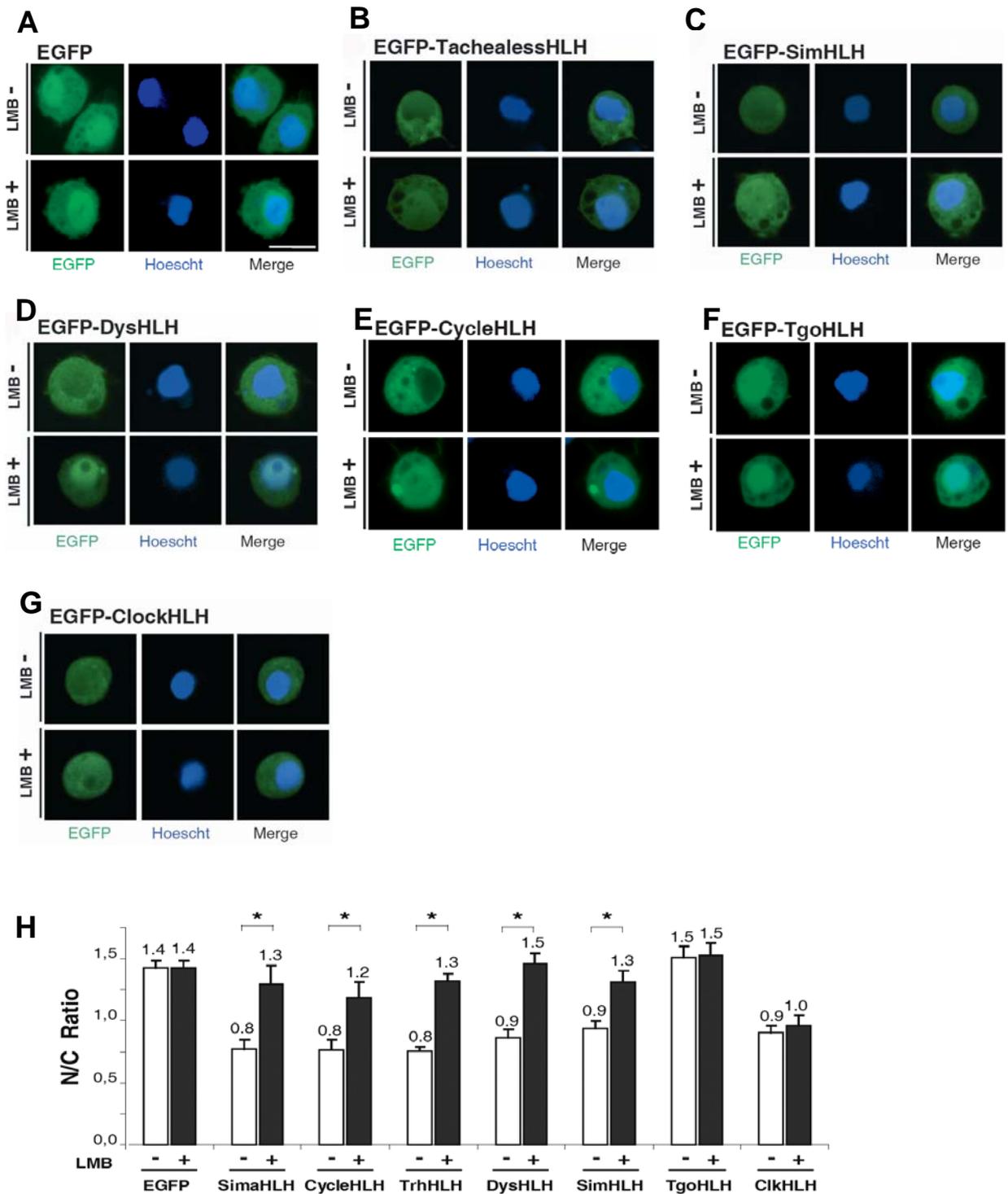


Figura 58: Las señales de exportación nuclear NES1 y NES2 se encuentran presentes en otras proteínas de la familia bHLH-PAS. (A-G) Se transfectaron en células S2 fusiones de EGFP a diferentes motivos HLH de factores de transcripción de la familia bHLH-PAS. La localización subcelular de las quimeras se analizó en presencia o en ausencia de LMB (Barra de escala: 10µm). (H) Se cuantificó por microscopía confocal la intensidad de fluorescencia relativa entre el núcleo y el citoplasma, analizándose al menos 10 células transfectadas con cada construcción y en cada condición (relación N/C: Núcleo vs. Citoplasma). Los resultados fueron analizados utilizando el test T-Student (*: $p < 10^{-4}$; $n > 10$).

DISCUSIÓN

1- Regulación de la localización subcelular dependiente de oxígeno de HIF- α

Se ha reportado que la localización subcelular de la proteína HIF-1 α humana se regula por oxígeno, localizándose en el citoplasma en normoxia y en el núcleo en hipoxia (Kallio y col., 1998). El proceso de importación nuclear ha sido caracterizado en bastante profundidad. La importación esta mediada por la vía clásica de importina- α /importina- β , donde la unión entre HIF-1 α e importina- α depende de la señal de localización nuclear C-terminal bipartita (C-NLS) de HIF α (Depping y col., 2008; Luo y Shibuya, 2001). Sima, al igual que HIF α , posee una localización subcelular regulada por el oxígeno (Dekanty y col., 2005; Lavista-Llanos y col., 2002). En nuestro laboratorio, M. Irisarri, demostró que la entrada de Sima al núcleo también depende de una NLS bipartita ubicada en la porción C-terminal de la proteína (Romero y col., 2008). Al comienzo de esta tesis, había en el campo de la regulación de la localización subcelular de HIF α , muchas preguntas por responder: ¿HIF- α es exportado de núcleo? ¿A través de qué mecanismo se exporta? ¿En qué contexto se torna relevante la exportación de HIF- α ? ¿La importación y/o exportación de HIF- α están reguladas por oxígeno? ¿Por qué sería necesario un mecanismo que regule la actividad de HIF mediante el control de la localización subcelular de su subunidad- α , dado que existen eficientes mecanismos que controlan la vida media y actividad transcripcional de la proteína? En esta tesis se han abordado estas preguntas, utilizando a HIF α /Sima de *Drosophila* como modelo experimental, contribuyendo a clarificar parte de los interrogantes planteados más arriba.

1.1- Sima es exportada del núcleo de manera dependiente de CRM1

Para analizar el mecanismo que controla la localización subcelular de Sima, hemos estudiado si dicha localización se ve afectada tras el agregado de LMB en un sistema de células S2 transfectadas con una quimera EGFP-Sima. Esta droga, que inhibe la acción de la exportina CRM1, provocó un cambio en la localización subcelular de la proteína de fusión, la cual se tornó predominantemente nuclear, imitando una situación de hipoxia. Hemos podido observar resultados similares cuando la proteína HIF-1 α humana fue transfectada en células U2OS, ya que la correspondiente proteína de fusión a EGFP se tornó más nuclear tras el agregado de LMB. Estos resultados sugieren que: 1) Las proteínas HIF- α se mueven continuamente entre el núcleo y el citoplasma y 2) que su exportación nuclear depende de CRM1.

Como mencionamos anteriormente, tanto HIF-1 α de mamíferos (Kallio y col., 1998), como Sima de *Drosophila* (Dekanty y col., 2005; Lavista-Llanos y col., 2002) se observan

mayormente en el citoplasma en normoxia y el núcleo en hipoxia. Si bien, se sugirió que esto podría depender de una activación de la importación nuclear en hipoxia (Kallio y col., 1998), nuestros resultados demuestran en cambio que la proteína se importa activamente al núcleo aún en normoxia. Hemos demostrado también que para que la proteína se encuentre localizada en el citoplasma en normoxia, es necesario que la misma sea exportada activamente del núcleo. Entonces, ¿Que ocurre en hipoxia para que la proteína se acumule en el núcleo? Nuestros resultados sugieren que existe una disminución de la exportación de la proteína ante la falta de oxígeno, de modo que las velocidades relativas de importación y exportación de HIF α se verían alteradas, inclinando el equilibrio hacia la acumulación nuclear. Ninguno de nuestros resultados permite descartar que, paralelamente a la disminución de la exportación nuclear de HIF α /Sima en hipoxia, su importación además se vea potenciada ante la falta de oxígeno.

1.2- El dominio bHLH de Sima y HIF-1 α es necesario para la exportación nuclear

La eliminación del dominio bHLH de Sima provocó un dramático aumento de la localización nuclear de la proteína, aún en normoxia, sugiriendo, que este dominio está involucrado en la exportación nuclear de la proteína. Debe tenerse en cuenta que el dominio bHLH participa en la interacción de la proteína con el DNA y también en la formación del heterodímero con la subunidad β . Una alteración de la capacidad de unión de la proteína al DNA podría provocar una disminución de su retención nuclear, favoreciendo un aumento de la exportación al citoplasma. Dado que esto es exactamente lo opuesto a lo observado en la mutante Sima Δ bHLH, la acumulación de la proteína en el núcleo no puede deberse a cambios en su capacidad de interacción con el DNA.

Muchas proteínas necesitan dimerizarse o interaccionar con subunidades accesorias para poder ser importadas al núcleo. De hecho, otras dos proteínas de la familia bHLH-PAS de *Drosophila* que forman heterodímeros con Tango, Tracheless y Singled-minded, necesitan de la presencia de Tango para poder localizarse en el núcleo (Ward y col., 1998). Por lo tanto, si este fuese también el caso de la proteína Sima, una disminución en su capacidad de interactuar con Tango provocaría un aumento de su localización citoplasmática. Siguiendo la misma línea de razonamiento, podemos concluir también que el aumento de la localización nuclear de Sima que se observa tras la eliminación del dominio bHLH no puede explicarse ni por una disminución de su capacidad de formar el heterodímero con Tango.

Hemos evaluado la capacidad del dominio bHLH tanto de Sima como de HIF-1 α de dirigir la exportación nuclear de la proteína reportera EGFP, en células S2. En ambos casos encontramos que la proteína de fusión EGFP-HIF1- α /Sima exhibía una localización claramente más

citoplasmática que la del control negativo EGFP y que la localización de dichas quimeras era sensible a LMB. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el dominio bHLH de HIF1- α /Sima participa en la exportación de la proteína a través de un mecanismo dependiente de CRM1.

1.3- Dentro del dominio bHLH se encuentran dos NESs que participan en la exportación nuclear de Sima y HIF1- α

Utilizando algoritmos de predicción de señales de exportación, encontramos dos NESs dependientes de CRM1 en el dominio bHLH de Sima que se encuentran respectivamente dentro de las α -hélices 1 y 2. Predicciones de estructura sugieren que la zona del dominio bHLH donde se encontrarían las dos NESs tendría características altamente flexibles de modo que permitiría el encaje de CRM1 (la Cour y col., 2004). Consistentemente con estas predicciones, hemos demostrado que tras la delección o mutación de la NES1 o la NES2 no sólo se ve aumentada la localización nuclear de Sima en normoxia, sino que también se encuentra disminuida la velocidad de su exportación nuclear en ensayos de reoxigenación. Estos resultados sustentan fuertemente la hipótesis de que los efectos observados tras la eliminación completa del dominio bHLH se deben efectivamente a una alteración directa del proceso de exportación de la proteína.

Por alineamiento de secuencias hemos podido inferir que estas NESs en el dominio bHLH se encuentran conservadas en todos los homólogos de HIF-1 α que hemos analizado, pertenecientes a diversos grupos filogenéticos, incluyendo insectos, peces, anfibios, aves y mamíferos. En ningún caso, hemos identificado posibles NESs en las subunidades HIF- β . Nuestros experimentos con quimeras en las que la proteína HIF-1 α humana fue fusionada a EGFP, sustentan la hipótesis de que las NES predichas en los distintos grupos filogenéticos serían funcionales, ya que la mutación de dos de los residuos hidrofóbicos en la NES1 y la NES2 de la proteína HIF-1 α humana provoca un aumento de la localización nuclear, acompañado por una pérdida de la sensibilidad a LMB. Proponemos por lo tanto, que la exportación nuclear mediada por NESs presentes en el dominio bHLH es un mecanismo conservado de regulación de las proteínas HIF- α .

1.4- Mecanismos dependientes e independientes de CRM1 cooperan en la exportación de Sima

En esta tesis hemos demostrado que CRM1 es responsable de la rápida exportación de Sima tanto en condiciones de normoxia, como durante la reoxigenación. Sin embargo, el hecho de que la exportación nuclear de una variante de Sima que carece del dominio entero HLH

(Sima Δ HLH) esté retrasada pero no totalmente bloqueada, sumado a la falta de función de las otras dos NES predichas (NES3 y NES4), sugiere que Sima podría además estar sujeto a un mecanismo de exportación nuclear independiente de CRM1. En este sentido, fue reportado previamente que la subunidad HIF-1 α humana se exporta del núcleo durante la reoxigenación a través de un mecanismo que depende del factor supresor de tumores VHL (Groulx y Lee, 2002), el cual a su vez, se mueve continuamente entre el núcleo y el citoplasma de manera independiente de CRM1 (Bonicalzi y col., 2001). Es razonable por lo tanto postular que mecanismos de exportación nuclear dependientes e independientes de CRM1 coexisten y cooperan en la determinación de la localización subcelular de las proteínas HIF- α .

1.5- Exportación regulada por niveles de oxígeno

Como discutimos más arriba, frente a la disminución de los niveles de oxígeno, probablemente ocurra una reducción o bloqueo de la exportación nuclear. La regulación de la exportación de una proteína suele depender de la modulación de su unión a la correspondiente exportina. Los principales mecanismos de regulación de la exportación CRM1-dependientes descritos hasta el momento se basan en el enmascaramiento inter o intramolecular de las NES, cambios en la afinidad de la NES por la exportina o en la retención nuclear de la proteína (Poon y Jans, 2005). Un claro ejemplo de exportación nuclear regulada por estímulos externos, está dado por la proteína p53. Esta proteína se mueve continuamente entre el núcleo y el citoplasma, pero ante un daño en el DNA se genera un bloqueo de la exportación debido a que dos NESs se inhiben por mecanismos diferentes. La NES1 sufre una fosforilación directa en dos serinas ubicadas dentro de la señal, provocando una disminución de su afinidad por CRM1 (Zhang y Xiong, 2001). La NES2 sufre de un enmascaramiento intermolecular dado por la tetramerización de p53 (Stommel y col., 1999). Ambos mecanismos cooperan, conduciendo a un bloqueo de la exportación y a la activación de la respuesta transcripcional mediada por p53 en respuesta al daño.

¿De qué manera la exportación nuclear de HIF- α estaría regulada por los niveles de oxígeno? En experimentos realizados en esta Tesis, hemos podido verificar que la localización subcelular de la quimera EGFP-SimaHLH no se ve influenciada por los niveles de oxígeno (datos no mostrados). Por lo tanto, parece ser que, si bien las NESs del motivo HLH son necesarias para la exportación nuclear de la proteína, este dominio no es suficiente para la regulación dependiente de oxígeno de la exportación nuclear. Deben por lo tanto existir otros elementos dentro de la proteína que regulen la interacción entre las NESs y CRM1. A priori, una posibilidad podría haber sido que la dimerización con HIF β /Tango o la unión al DNA provocase un enmascaramiento de las NESs, impidiendo la unión de CRM1, inhibiendo por lo tanto la

exportación. Nuestros resultados en los que se manipularon los niveles de Tango no mostraron efecto sobre la localización subcelular de Sima, sugiriendo que Tango no interviene en la exportación. No podemos sin embargo descartar que los embriones de *Drosophila* presenten “efecto materno” (aporte de mRNA por parte del ovario de la madre) que mantenga niveles relativamente elevados de proteína Tango durante los experimentos. Los fenotipos traqueales observados en el mutante Tgo^{PY} sugerirían sin embargo que los niveles de Tango están severamente reducidos.

Se ha reportado que HIF- α sufre una gran variedad de modificaciones postraduccionales en respuesta a cambios en los niveles de oxígeno. Probablemente, las modificaciones más relevantes son la hidroxilación de las prolinas localizadas en el ODDD (Bruick y McKnight, 2001; Epstein y col., 2001; Ivan y col., 2001; Jaakkola y col., 2001) y de la asparragina en el dominio C-terminal (Hewitson y col., 2002; Lando y col., 2002a; Lando y col., 2002b), aunque también se ha reportado la existencia de fosforilación en serinas y treoninas (Minet y col., 2001; Richard y col., 1999; Sodhi y col., 2000) y acetilación de HIF α (Jeong y col., 2002; Tanimoto y col., 2000), entre otras modificaciones dependientes de oxígeno. Una posibilidad es que alguna de estas modificaciones post-traduccionales altere la afinidad de las NES por CRM1 o que simplemente modifique el plegamiento de HIF- α , exponiendo u ocultando las NES. En este sentido, M. Irisari encontró en nuestro laboratorio, que el reemplazo de la prolina hidroxilable por alanina (P850A), lo cual impide la hidroxilación por parte de Fatiga, induce la localización constitutivamente nuclear de Sima aún en normoxia (Irisari y col., manuscrito en preparación). También en el mutante de Fatiga se observa localización de Sima constitutivamente nuclear, indicando una relación directa entre la hidroxilación de la prolina 850 y la localización subcelular de la proteína. Es razonable postular que la hidroxilación de P850 podría generar un cambio en la conformación de Sima, ocasionando que las NES queden expuestas para unirse a CRM1. En este modelo, la falta de hidroxilación de P850 provocaría que las NES queden enmascaradas e inaccesibles a CRM1. Experimentos adicionales permitirán contrastar esta hipótesis o eventualmente, definir otros mecanismos por los cuales el oxígeno regula la exportación de HIF α .

2- La exportación nuclear de HIF- α como mecanismo para controlar la actividad del factor de transcripción

Hemos demostrado que Sima se mueve continuamente entre el núcleo y el citoplasma y que en normoxia, la exportación nuclear prevalecería sobre la importación. A fin de determinar si la exportación nuclear de Sima puede representar un mecanismo de control de la actividad

transcripcional del heterodímero, medimos el grado de activación de la vía de respuesta a hipoxia en embriones que tenían mutadas las NES del dominio bHLH de Sima, viéndose por lo tanto afectado el mecanismo de exportación nuclear de la proteína. Dado que el dominio bHLH de Sima esta involucrado tanto en la interacción con el DNA, como en la dimerización con Tango, realizamos un *screen* de mutaciones dentro de cada una de las NES del dominio bHLH, hasta encontrar una mutación en cada una de ellas que afectaba la exportación nuclear, pero mantenía intacta su capacidad de interactuar con Tango. Logramos identificar dos mutantes de Sima, las variantes SimaL104A y SimaM115A, que si bien eran transcripcionalmente activas, ambas presentaban una reducción de alrededor del 40% de su actividad en cultivos celulares en condiciones que simulan hipoxia extrema. Cuando la actividad transcripcional de estas dos mutantes de Sima fue analizada in vivo, en embriones transgénicos en condiciones de normoxia, en ambos casos pudo verificarse un claro aumento de la actividad de la proteína en comparación con la actividad de Sima salvaje. Nuestra interpretación es que, dañando el mecanismo de exportación nuclear de Sima, se incrementa la actividad del heterodímero Sima-Tgo en normoxia, ya que esta condición la exportación nuclear cobra máxima importancia como mecanismo regulatorio negativo. El efecto es especialmente notable si se considera que la actividad intrínseca de estas variantes de Sima (en condiciones de máxima activación de la vía) es menor que la actividad de la proteína salvaje. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la exportación nuclear de Sima contribuye a la regulación dependiente de oxígeno de la actividad transcripcional, agregando un nuevo elemento a la complejidad regulatoria de las proteínas HIF- α (Fig. 59).

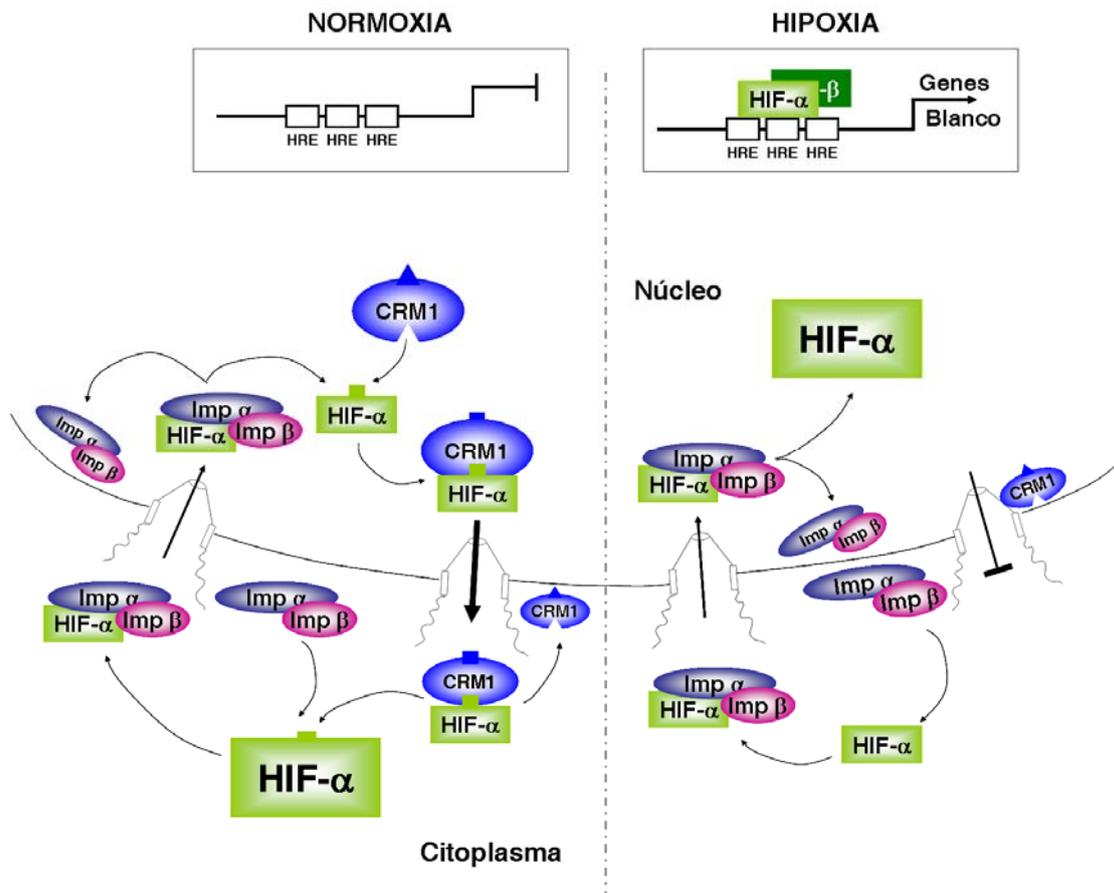


Figura 59. Modelo de regulación de la localización subcelular dependiente de de oxígeno de HIF- α . HIF- α se mueve continuamente entre el núcleo y el citoplasma, siendo importado por el complejo importina- α /importina- β y exportado por CRM1. La disminución de los niveles de oxígeno alteraría las velocidades relativas de importación y exportación, provocando un cambio en la localización de esta subunidad en el equilibrio. La localización nuclear en hipoxia permite la unión a los HRE, provocando la transcripción de los genes blanco.

3- Exportación vs. Degradación de HIF- α

¿Cómo interacciona este nuevo mecanismo regulatorio (la exportación nuclear) con mecanismos previamente caracterizados tales como la degradación en el proteasoma de 26S? Si bien se ha reportado que la degradación proteasomal de las proteínas HIF- α de mamíferos puede ocurrir tanto en el núcleo como en el citoplasma, la eficiencia con la que este proceso se

da en cada uno de los compartimentos parece depender del tipo celular. Se ha reportado que en células en activa proliferación, la degradación sólo ocurriría con alta eficiencia en el citoplasma, mientras que en células que no están proliferando, la eficiencia de la degradación proteasomal sería similar en ambos compartimentos (Berra y col., 2001b; Zheng y col., 2006). En línea con esto, podemos especular que en las células proliferativas, HIF- α debería primero ser exportado del núcleo para poder ser degradado en el citoplasma, mientras que en células que no están proliferando, la exportación nuclear no sería un requisito necesario para la degradación. Siguiendo con esta línea de razonamiento, la exportación nuclear de HIF α sería un mecanismo regulatorio especialmente relevante durante el desarrollo embrionario y en células cancerígenas, las cuales son altamente proliferativas. En tipos celulares poco proliferativos, la degradación proteasomal y la exportación nuclear funcionarían como dos mecanismos paralelos que operarían de manera aditiva o sinérgica para conseguir el silenciamiento de la actividad del factor de transcripción en condiciones de normoxia.

Dado que el control de la actividad de muchos factores de transcripción ocurre generalmente a distintos niveles, a través de mecanismos parcialmente redundantes que operan de manera simultánea para asegurar un control preciso de la actividad transcripcional, es razonable postular que HIF α también esté controlado por mecanismos parcialmente redundantes (exportación nuclear y degradación proteasomal) que cooperan en el silenciamiento de la proteína.

En *Drosophila*, no se ha estudiado en qué compartimento ocurre la degradación proteasomal de Sima; sin embargo, debido a la alta similitud en los mecanismo regulatorios de esta vía entre los dos modelos experimentales, podemos especular que la degradación también ocurre en ambos compartimentos.

4- NES1 y NES2 están conservadas en el dominio bHLH de otras proteínas de la familia bHLH-PAS

Por alineamiento de secuencias, hemos podido inferir que las NESs dependientes de CRM1 se encuentran conservadas en las α -hélices del dominio bHLH de varias proteínas de la familia tanto en *Drosophila* como en otras especies (Figura 57). En humanos, el receptor de compuestos aril hidrocarbonados (Ahr) tiene conservadas ambas NESs, NES1 y NES2, dentro del dominio bHLH y se ha demostrado que dichas NES son funcionales (Ikuta y col., 2002; Pollenz y Barbour, 2000). Los estudios reportados en esta tesis amplían esta observación ya que encontramos que existirían NESs en el dominio bHLH de varios otros miembros de la familia bHLH-PAS, sugiriendo que la regulación basada en la exportación nuclear de estas proteínas es un mecanismo que define a un subgrupo de estos factores de transcripción. Hemos analizado la localización subcelular de varias quimeras EGFP-HLH correspondientes a diferentes proteínas bHLH-PAS de *Drosophila* y encontramos que los motivos HLH que contienen las NESs

predichas efectivamente son capaces de promover la exportación nuclear del reportero. Interesantemente, algunas de estas proteínas contienen tanto la NES1 como la NES2; éstas son la proteína circadiana Cycle y el regulador maestro del desarrollo del sistema respiratorio Trachealess, además de Sima, ampliamente caracterizada en esta Tesis.

Otro subgrupo de proteínas de la familia presenta solamente la NES1, como por ejemplo el regulador maestro del desarrollo de la glia Singled-minded y Dysfusion, que es un factor de transcripción que promueve la fusión de ramas traqueales. Si bien tanto la NES1 como la NES2 son requeridas para la exportación nuclear de Sima, en estas proteínas que contienen solamente una NES (la NES1), hemos observado que dicha NES es suficiente para mediar la exportación nuclear, al menos en el contexto del motivo HLH aislado. Queda por responder si la presencia de una sola NES dentro del dominio bHLH es suficiente para interactuar con CRM1, en el contexto de la proteína entera.

Otro punto que es interesante destacar es que, las NESs de los dominios bHLH estarían presentes solamente en una de las dos subunidades de los heterodímeros: tanto Sima como Trachealess, Singled-minded y Dysfusion presentan al menos una NES en el dominio bHLH, pero Tango, que representa la subunidad β en todos estos casos, no tiene ninguna NES. Lo mismo ocurre en el caso de Cycle y Clock; mientras que Cycle presenta las dos NESs en el dominio bHLH, la proteína Clock que forma el heterodímero con Cycle, no tiene ninguna NES dentro de este dominio.

¿Por qué estas NES estarían conservadas en muchos miembros de la familia bHLH-PAS? Proponemos en esta Tesis que la presencia de las dos NESs y la exportación dependiente de CRM1 en general representan un mecanismo que contribuye a la regulación de la actividad transcripcional de miembros de esta familia que están controlados por estímulos externos, tales como la proteína Ahr de mamíferos, la cual es activada por los ligandos xenobióticos (Pollenz y Barbour, 2000), o Sima cuya actividad depende de la tensión ambiental de oxígeno (Bacon y col., 1998; Centanin y col., 2005; Dekanty y col., 2005; Gorr y col., 2004; Lavista-Llanos y col., 2002; Nambu y col., 1996). Consistentemente con esto, se ha descrito que la localización subcelular de un típico regulador del desarrollo, Trachealess, está también regulada por la actividad de la vía de PI3K/Akt (Jin y col., 2001). Por lo tanto, es concebible que otros miembros de la familia bHLH-PAS, tales como la proteína circadiana Cycle u otras proteínas bHLH-PAS implicadas en procesos de desarrollo, como Singled-minded y Dysfusion, puedan también estar moduladas por señales que regulan su localización subcelular. Trabajos futuros permitirán determinar fehacientemente hasta qué punto y en qué medida la exportación nuclear dependiente de CRM1 es una característica típica de la regulación de muchas proteínas de la familia bHLH-PAS.

CONCLUSIONES

- Sima se mueve continuamente entre el núcleo y el citoplasma y la exportación nuclear depende al menos en parte de CRM1.
- Sima se exporta rápidamente luego de la reoxigenación, con un tiempo medio de exportación de tres minutos.
- La exportación de Sima parece no depender de Tango.
- El dominio bHLH de Sima contiene dos Señales de Exportación Nuclear, NES1 hacia la porción C-terminal de la hélice 1 y NES2 hacia la parte N-terminal de la hélice 2.
- La NES1 y la NES2 son secuencias canónicas de reconocimiento de CRM1 que median la exportación nuclear de la proteína.
- La exportación de Sima regula negativamente la respuesta transcripcional a hipoxia.
- HIF-1 α humano parece estar regulado, al menos en parte, por CRM1 a través de la NES1 y la NES2 que están conservadas filogenéticamente.
- La NES1 y la NES2 se encuentran además conservadas en otras proteínas de la familia bHLH-PAS, pero en solamente una de las dos subunidades que conforman el heterodímero.
- La exportación nuclear CRM1-dependiente podría funcionar como mecanismo regulatorio de una amplia gama de proteínas de la familia bHLH-PAS.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Construcciones de DNA

1.1-Construcciones utilizadas en células S2

Para generar la construcción **EGFP-Sima**, la secuencia codificante de EGFP fue amplificada a partir del plásmido pEGFP-C1 (clontech, Inc.) utilizando los siguientes oligonucleótidos: sentido (5'GCTTCGCCGCGGTCTAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG3') y antisentido (5'GCTTCGCCGCGGGGTGGATCCCGGGCCTGC3'), que incluyen sitios de restricción para SacII en sus extremos 5'. A continuación, clonamos el producto de PCR en el sitio SacII en fase con la secuencia codificante de Sima en el vector pGEM-T (Promega). Finalmente, EGFP-Sima fue subclonada en los sitios XbaI-NotI del vector pMT/Bip/V5-His. La eliminación de EGFP para los análisis de actividad transcripcional se realizó por digestión con EcoRI y posterior religación.

EGFP-Sima Δ HHLH fue obtenida por digestión parcial de pMT-EGFPSima con la enzima NruI y posterior religación. Esto resultó en la delección de 141 nucleótidos comprendiendo los aminoácidos 78 a 124 de Sima.

Las mutaciones **SimaF92Y**, **SimaL101A**, **SimaM115A** y **SimaI124A** fueron generadas por PCR de ensamblaje; el producto resultante fue digerido con BglIII dando un fragmento de 706 pares de bases, el cual reemplazó al fragmento salvaje original en pMT-EGFPSima. Para la PCR de ensamblaje se utilizaron los oligonucleótidos externos comunes sentido: (5'GATCACATGGTCCTGCTGGAGTT3') y antisentido: (5'AGCTAGTGGAAGAAGTCCTTGATCT-3') y los siguientes oligonucleótidos internos específicos para cada caso: SimaF92Y sentido (5'CAAGGAGACAGAGATATACATGGA ACTCTCGGCTGC3') y antisentido (5'GCAGCCGAGAGTTCCATGTATATCTCTGTCTCCTTG3'), SimaL101A sentido (5'-CTGCTTTGCCAGCGAAAACCGACGATGTCAAC3') y antisentido (5'GTTGACATCGTCGGTTTTTCGCTGGCAAAGCAG3'), SimaM115A sentido (5'GCCTCCGTGGCTAGGATCACCATCGCTTTCC3') y antisentido (5'GGAAAGCGATGGTGATCCTAGCCACGGAGGC3') y SimaI124A sentido (5'CGCTTTCCTCAAGGCTCGTGAAATGCTGCA3') y antisentido (5'TGCAGCATTTACGAGCCTTGAGGAAAGCG-3'). La secuencia de EGFP fue eliminada por digestión con EcoRI y posterior religación.

El reportero transcripcional **pGL3-HRE-Luc** para transfección de células S2 fue generada previamente en el laboratorio (Dekanty y col., 2005). Las construcciones utilizadas respectivamente como control negativo y positivo en ensayos de transfección en células S2, **EGFP**, y **EGFP-NES** en el plásmido pMT/Bip/V5-His, fueron gentilmente cedidas por el Dr. Christos Samakovlis de la Universidad de Estocolmo (Roth y col., 2003).

Las construcciones **EGFP-NES1-4** y **EGFP-NES2mut** fueron generadas utilizando oligonucleótidos fosforilados, los cuales fueron insertados los sitios XbaI y NotI del plásmido pMT/Bip/V5-His-EGFP (Roth y col., 2003). Los oligonucleótidos utilizados en cada caso fueron los siguientes: NES1,

Sentido (5'PhoCTAGATTCATGGA~~ACTCTCGGCTGCTTTGCCATTGTAAGC~~3') y
antisentido (5'PhoGGCCGCTTACAATGGCAAAGCAGCCGAGAGTTCCATGAAT3');

NES2, sentido
(5'PhoCTAGAATGAGGATCACCATCGCTTTCCTCAAGATTCGCGAAATGCTGCAGTT
CTTAGC3') y antisentido

(5'PhoGGCCGCTTAGAACTGCAGCATTTCGCGAATCTTGAGGAAAGCGATGGTGATC
CTCATT3'); NES2mut, sentido

(5'PhoCTAGAATGAGGGCCACCATCGCTTTCGCGCAAGATTCGCGAAATGCTGCAGTT
CTTAGC3') y antisentido

(5'PhoGGCCGCTTAGAACTGCAGCATTTCGCGAATCTTGCGAAAGCGATGGTGGCC
CTCATT3'); NES3, sentido

(5'PhoCTAGATTCAGGACTTTCAGCAGCTGCAGCAGGAGTTGCAGTTGCAGGAGGA
ATAAGC3') y antisentido

(5'PhoGGCCGCTTATTCCTCCTGCAACTGCAACTCCTGCTGCAGCTGCTGGAAAGTCC
TGAAT3'); NES4, sentido

(5'PhoCTAGACAGAACATTATCTTGAATGCAGTGCCATTGATTACCATACAGAATAA
CTAAGC3') y antisentido

(5'PhoGGCCGCTTAGTTATTCTGTATGGTAATCAATGGCACTGCATTCAAGATAATGT
TCTGT3').

EGFP-SimaHLH, **EGFP-TgoHLH**, **EGFP-SimHLH**, **EGFP-DysHLH**, **EGFP-CycleHLH**, **EGFP-TrachealessHLH**, **EGFP-ClockHLH**, **EGFP-HIF1 α HLH** y **EGFP-HIF2 α HLH**

fueron generadas por clonado en fase de las secuencias codificantes correspondientes a los distintos motivos HLH amplificadas por PCR, en los sitios XbaI y NotI del plásmido pMT/Bip/V5-His-EGFP, (Roth y col., 2003). Para la fusión EGFP-SimaHLH se utilizó como molde la construcción pMT-GFP_{Sima} con los primers: sentido

(5'GCTCTAGATCTCGCGATGCGGCTAGATGTC3') y antisentido

(5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTAGAACTGCAGCATTTCGCGAATCTTG3'). Para las fusiones EGFP-TgoHLH, EGFP-SimHLH, EGFP-DysHLH y EGFP-CycleHLH las secuencias

correspondientes fueron amplificadas a partir de DNAc obtenido a partir de de células S2 utilizando los siguientes oligonucleótidos: para Tango, sentido (5'GCTCTAGACGCCGCAACAAGATGACGGCC3') y antisentido (5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTAGGTATTTCTGTGCCACGCAGTGC3'); para Sim, sentido (5'GCTCTAGAAGCAAAAATGCGGCACGCACGCGAC3') y antisentido (5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTAATCGGGAAAGACTTGGCGCATTTTC3'); para Dys, sentido (5'GCTCTAGATCGACGAAGGGCGCCTCGAAGATG3') y antisentido (5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTAGAAGTAGTTGGCTTTCCGCACATAG3'); para Cycle, sentido (5'GCTCTAGAAATCACAGCGAGATCGAGAAGCGG3') y antisentido (5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTAGATCCCTCGCAGATGCTGCAC3'). Las secuencias necesarias para generar las fusiones EGFP-TrachealessHLH y EGFP-ClockHLH fueron amplificadas a partir de DNAc proveniente de embriones de *Drosophila* utilizando los siguientes oligonucleótidos: Trachealess, sentido (5'GCTCTAGATCGAGGGACGCGGCGAGATCGCGGC3') y antisentido (5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTAGGAGAAATCCCTCAGCTTCAGGTAGCT3') y Clock, sentido (5'GCTCTAGACGACGAGATCAGTTCAACTCGCTGGTC3') y antisentido (5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTATATTTTCGAAAACCTTGAGCGATCG3'). Las secuencias para generar las fusiones EGFP-HIF1- α HLH y EGFP-HIF2- α HLH fueron amplificadas a partir de DNAc de células humanas (HeLa) utilizando los siguientes oligonucleótidos: HIF1 α , sentido (5'GCTCTAGATCTCGAGATGCAGCCAGATCTC3') y antisentido (5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTATTTCTCACACGCAAATAGCTGAT3'); HIF2 α , sentido (5'GCTCTAGATCCCGAGATGCTGCGCGGTG3') y antisentido (5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTACTTGTGTGTTTCGCAGGAAGCTGAT3').

1.2- Construcciones utilizadas para generar líneas transgénicas. Formas deletionadas o mutagenizadas de Sima

Para las construcciones **Sima.mNES3** y **Sima.mNES4**, se generó por PCR de ensamblaje un fragmento conteniendo las mutaciones correspondientes, el cual fue posteriormente digerido con BamHI y el producto resultante de 842 pares de bases fue finalmente remplazado en el vector pUAST-Sima. Para generar los fragmentos por PCR de ensamblaje se utilizaron los primers externos comunes: sentido (5'AGCTTCAACGGTCTCATCATTGTC3') y antisentido (5'TTCTTTAGTACCGAGTTCGACTGCTG3'). Las mutaciones fueron introducidas utilizando los siguientes oligonucleótidos internos degenerados específicos que contenían las mutaciones correspondientes: para Sima.mNES3, sentido (5'GCAGCAGGAGGCTCAGGCTCAGGAGGAACAG3') y antisentido (5'CTGTTCTCTCTGAGCCTGAGCCTCCTGCTGC3'); para Sima.mNES4, sentido (5'-

GCAGTGCCATTGGCTACCGCACAGAATAACAAG3') y antisentido (5'CTTGTTATTCTGTGCGGTAGCCAATGGCACTGC3').

Para generar **Sima Δ NES1**, **Sima Δ NES2**, **Sima.mNES1**, **Sima.mNES2** se amplificaron por PCR de ensamblaje fragmentos conteniendo las mutaciones correspondientes, los cuales fueron posteriormente digeridos con BglII y el producto resultante de 706 pares de bases, remplazado en el vector pMT-EGFPSima. Para la PCR de ensamblaje se utilizaron los siguientes oligonucleótidos externos comunes: sentido (5'GATCACATGGTCCTGCTGGAGTT3') y antisentido (5'AGCTAGTGGAAGAAGTCCTTGATCT3'); y los siguientes oligonucleótidos internos degenerados específicos conteniendo las mutaciones: para Sima Δ NES1, sentido (5'CAGAGATAAAAACCGACGATGTCAACCAACTGG3') y antisentido (5'CGGTTTTTATCTCTGTCTCCTTGGAGCGACGA3'); Sima Δ NES2, sentido (5'CTGGGCACCACGGAGGCCTTGTCCAGTTGGTTGACATC3') y antisentido (5'CCTCCGTGGTGCCAGCTTGCGCGACTGCAATG3'); Sima.mNES1, sentido (5'ATTCATGGCAGCCTCGGCTGCTGCACCATTGAA3') y antisentido (5'TTCAATGGTGCAGCAGCCGAGGCTTCCATGAAT3'); Sima.mNES2, sentido (5'GATGAGGGCCACCATCGCTTTCGCCAAGATTCG3') y antisentido (5'CGAATCTTGGCGAAAGCGATGGTGGCCTCTATC3'). Una vez obtenidas, las formas mutagenizadas de Sima fueron subclonadas en el vector pUAST (Brand y Perrimon, 1993), utilizando los sitios de restricción EcoRI y NotI.

Las demás formas mutagenizadas de Sima (**Sima Δ HLH**, **SimaF92Y**, **SimaL101A**, **SimaM115A** y **SimaI124A**) fueron generadas en el vector pMT-EGFPSima como se describió más arriba y luego clonadas en el vector pUAST (Brand y Perrimon, 1993) usando los sitios de restricción EcoRI y NotI.

1.3- Construcciones de HIF utilizadas para experimentos en células de mamíferos

La secuencia del **HIF-1 α** humano fue amplificado por PCR utilizando como molde DNAC de células HeLa y los oligonucleótidos sentido (5'CGGGGTACCGCGAACGACAAGAAAAAGATAAGTTC3') y antisentido (5'CGGGGTACCTTTAGGTAGTGAGCCACCAGTGTC3') conteniendo sitios para KpnI en los extremos. El fragmento de PCR resultante fue clonado en el vector pEGFP-C1 (Clontech, Inc.) utilizando los sitios KpnI.

Para la construcción **HIF-1 α NES12mut** se generó un fragmento por PCR de ensamblaje conteniendo las mutaciones correspondientes, el cual fue posteriormente digerido con HindIII y

el producto resultante de 912 pares de bases fue remplazado en la construcción pEGFP-C1-HIF-1 α . Se realizaron dos PCR de ensamblaje consecutivas; en la primera se introdujeron las mutaciones correspondientes a la NES1 y en la segunda, se introdujeron las mutaciones correspondientes a la NES2, utilizando como molde el producto de la primera PCR de ensamblaje. Ambas PCRs de ensamblaje se realizaron utilizando los oligonucleótidos externos sentido (5'CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCG3') y antisentido (5'CTGGTCATCAGTTTCTGTGTCGTTGCTG3'); los oligonucleótidos internos de la primera PCR de ensamblaje fueron los siguientes: sentido (5'GCTTGCTCATCAGGCTCCAGCTCCACATAATGTG3') y antisentido (5'CACATTATGTGGAGCTGGAGCCTGATGAGCAAGC3'); los de la segunda PCR de ensamblaje fueron: sentido (5'GATGAGGCTTACCGCCAGCTATGCTCGTGTGAG3') y antisentido (5'CTCACACGAGCATAGCTGGCGGTAAGCCTCATC3').

1.4- Construcciones empleadas en los ensayos de doble híbrido en levaduras

El plásmido pJG4-5.**Tango** fue gentilmente cedido por el Dr. Steve Crews (Ward y col., 1998). Para generar las construcciones empleadas como presa, la porción amino terminal de **Sima** (aminoácidos 32-494) o de las mutantes **SimaF92A**, **SimaL101A**, **SimaI124A**, y **SimaM115A** fueron amplificadas por PCR utilizando los oligonucleótidos comunes sentido: (5'CGGAATTCTGTTCTTCTTCGTTCTCGTCTCCCCACC3') y antisentido: (5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTATTTCTCTGCTTTCTCGTCTCAAGTTGC3'), conteniendo en sus extremos los sitios de restricción EcoRI o NotI. Se utilizaron como molde a los plásmidos pUAST-Sima, pUAST-SimaF92A, pUAST-SimaL101A, pUAST-SimaI124A o pUAST-SimaM115A. Posteriormente, cada uno de los fragmentos de 1393 pares de bases correspondientes a cada una de las variantes de Sima fue digerido con las enzimas de restricción mencionadas y clonados en el vector pEG-202.

2- Líneas celulares

2.1- Células S2 de Drosophila. Mantenimiento, transfección y tratamientos farmacológicos

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 para células de *Drosophila* (Sigma), conteniendo 10% de suero fetal bovino (Gibco), 50 unidades/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomycin. Las transfecciones se realizaron con un total de 5 μ g/ml de DNA, utilizando el método del fosfato de calcio (Invitrogen). La expresión de las proteínas recombinantes fusionadas a EGFP fue inducida por agregado de 0,4 mM de sulfato de cobre durante 4 a 6 horas. 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 –6 a 12 horas luego de la inducción con sulfato de cobre- y el resultado fue visualizado inmediatamente después en el microscopio confocal. Para marcar los núcleos se aplicó la solución de Hoechst 33342, a una concentración final de 2,24 µg/ml durante 5 minutos.

2.2- Células COS-7: Mantenimiento, transfección y tratamientos

Para los experimentos de transfección transitoria realizados en esta tesis, se utilizaron células de las líneas COS-7 y U2OS. Estas líneas celulares fueron mantenidas en placas de plástico de 10 cm de diámetro con medio completo a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Como medio completo se utilizó D-MEM con baja glucosa (Invitrogen), al cual se le agregó 10% v/v de suero fetal bovino y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomycin). Antes de que las células alcancen la confluencia total, se aspiró el medio de cultivo y se colocó 1 ml de tripsina 2,5 % p/v. Luego de incubar a temperatura ambiente durante dos o tres minutos, se detuvo la reacción con 3 mililitros de medio completo, se replaqueó entre 1/4 y 1/8 del volumen a una nueva placa de plástico de 10 cm y se llevó a 8 ml de volumen final con medio completo. Las células fueron congeladas en N₂ líquido y descongeladas siguiendo protocolos convencionales.

Las células COS-7 y U2OS fueron transfectadas con el kit Transit-LT1 (mirrus) o con Lipoafectamina 2000 (invitrogen) siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Para el análisis de la localización subcelular de HIF-1 α se plaquearon las células U2OS en placas de plástico de 6 pocillos (cada pocillo tiene un diámetro aproximado de 3,5 cm) dos días antes de realizar la transfección. En el caso de los experimentos de co-inmuprecipitación las células COS-7 se sembraron en placas de 10 cm el día previo a realizar la transfección. La cantidad de plásmido total transfectado se ajustó a 2 µg para una cantidad de 6 µl de lipofectamina.

3- Medición de la actividad transcripcional de las mutantes de Sima en células S2

En los experimentos de transfección transiente destinados a determinar la actividad transcripcional de distintas variantes de Sima, se plaquearon 1x10⁶ células por pocillo en placas de 12 pocillos. Se transfectaron 6.0 µg totales de DNA por reacción de transfección y en todos los ensayos se co-transfectó, junto con la mutante de Sima que se quería analizar (2 µg), el reportero LDH-Luciferasa (3 µg) y el plásmido pAct-LacZ (1µg) para normalizar la eficiencia de transfección. Las transfecciones se llevaron a cabo utilizando el Kit Calcium Phosphate Transfection Kit (Invitrogen). Veinticuatro horas después de la transfección se indujo la expresión de las construcciones de Sima con sulfato de cobre y veinte horas antes de la medición de luciferasa se agregó desferrioxamina (DFO).

3.1- Medición de actividad luciferasa

Para medir actividad luciferasa se utilizó el kit comercial Steady-Glo luciferase assay system (Promega), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las determinaciones de actividad luciferasa se realizaron en un luminómetro TECAN, Genios.

3.2- Medición de actividad β -galactosidasa a partir de extractos celulares (modificado del Molecular Cloning Laboratory Manual (Golemis, 2001).

A efectos de normalizar la eficiencia de transfección se midió la actividad β -galactosidasa (β -gal), utilizando o-nitrofenil β -D-galactopiranosido (ONPG) como sustrato. Se tomaron 150 μ l de células, las cuales fueron centrifugadas (2 min 7000 rpm) y el pellet resultante fue resuspendido en buffer de lisis (0.1M Tris-Cl pH 7.8, 0.5% Tritón X-100). El producto de lisis fue centrifugado 3 min a 2500g (4°C) y el sobrenadante fue utilizado para medir actividad. El ensayo se llevó a cabo por duplicado en una placa de 96 pocillos, para lo cual se colocaron en cada pocillo 180 μ l de buffer de reacción (1.1 mM de Cl_2Mg , 50 mM de β -mercaptoetanol, 1 mg/ml de ONPG, Buffer fosfato de sodio 0.1 M pH7.5) y 20 μ l de extracto celular. La reacción se llevó a cabo a 37°C y se determinó la absorbancia a 415 nm a diferentes tiempos (0, 10, 20, 30 y 40 minutos).

3.3- Normalización

La normalización de los resultados se llevó a cabo calculando el cociente entre los valores de actividad luciferasa y β -galactosidasa obtenidos para cada pocillo de células transfectadas.

4- Líneas de moscas utilizadas

La línea conteniendo el reportero transcripcional: **LDH.LacZ** fue generada previamente en el laboratorio (Lavista-Llanos y col., 2002). La línea **en.Gal4/CyO** (generada por K. Yoffe y A. Brand) fue gentilmente provista por Ana Macias de la Universidad Nacional de Córdoba. La línea **en.Gal4/Tm3** fue generada previamente en el laboratorio por Maximiliano Irizarri. La línea **UAS.Sima** generada previamente en el laboratorio (Lavista-Llanos y col., 2002). **UAS.GFPn.lacZ** fue cedida por Shigeo Hayashi del “Riken Center for Developmental Biology” en Kobe, Japón. La línea **TgoPY** fue obtenida del Banco de moscas de la Universidad de Indiana en Bloomington, USA.

5- Moscas transgénicas

Para la generación de moscas transgénicas se utilizó la estrategia de transformación de la línea germinal mediada por Elementos P. Las construcciones de DNA a transformar fueron generadas en el vector pUAST e inyectadas junto a un plásmido *helper*, que codifica para la Transposasa. Los embriones de genotipo yw fueron inmovilizados sin decorionar sobre una cinta doble faz pegada a un portaobjetos e inyectados no más de 30 minutos luego de la ovipuesta. Para las inyecciones se utilizaron capilares Narishige de 1mm de diámetro x 90mm de largo, los cuales fueron previamente confeccionados en un estirador vertical Narishige PC-10 (seteado en dos etapas a 63 °C y 68.9 °C, respectivamente). La solución de inyección contenía 0,4µg/µl del plásmido pUAST y 0,25µg/µl de plásmido T-helper en 10µl de búfer de inyección [5mM KCl, 0,5mM NaH₂PO₄ pH 7.8]; la solución a inyectar fue centrifugada durante 10 minutos a 10000g y transferida a un nuevo tubo antes de la inyección. Los embriones fueron inyectados bajo un microscopio Olympus BH, sumergidos en aceite halocarbonado 700 (Sigma H8898) para evitar la deshidratación, utilizando el microinyector Tranjector 5246 (Eppendorf). Luego los embriones se dejaron desarrollar a 18°C durante 48 horas y las larvas que emergieron durante las siguientes 24 horas fueron transferidas a un vial con medio de cultivo. Los adultos obtenidos fueron cruzados de manera individual con moscas yw y, de la progenie obtenida, se eligieron moscas con ojos amarillos, anaranjados o rojos, lo cual denota la presencia del elemento P integrado en el genoma. Las inserciones en cada una de las líneas transgénicas obtenidas fueron mapeadas por análisis de segregación (ver más adelante), luego de lo cual se establecieron líneas transgénicas estables homocigotas o heterocigotas contra un cromosoma balanceador.

6- Cromosomas Balanceadores

Los cromosomas balanceadores contienen múltiples inversiones en ambos brazos, lo que determina que tengan una baja probabilidad de recombinación con sus cromosomas homólogos normales. Cuando estos cromosomas llevan también mutaciones como marcadores fenotípicos dominantes, se convierten en herramientas poderosas para el análisis de segregación en la progenie y en la síntesis de genotipos definidos. Los cromosomas balanceadores pueden, además, llevar marcadores moleculares (como los genes LacZ o GFP), que permiten su identificación por tinción y/o directamente al microscopio de fluorescencia, en estadios embrionarios o larvales. Esto es particularmente útil en el análisis de poblaciones de embriones, ya que permite identificar individuos homocigotos para la mutación de interés por ausencia del cromosoma balanceador.

Otra característica de los cromosomas balanceadores es que portan mutaciones letales recesivas, lo cual impide la obtención de individuos homocigotos para el balanceador. Esto constituye una gran ventaja porque permite la generación y el mantenimiento de líneas que portan mutaciones

letales, en donde sobrevivirán sólo aquellos adultos heterocigotas para el cromosoma balanceador y su cromosoma homólogo con la mutación letal de interés.

7- Mapeo de las líneas transgénicas

Con el objeto de determinar en qué cromosoma quedó insertada la construcción inyectada, realizamos un mapeo por análisis de segregación del marcador dominante mini-white (w^+) codificado en el elemento P. Para ello, cruzamos machos conteniendo la construcción de interés (ojos rojos por el marcador w^+) con hembras conteniendo dos cromosomas balanceadores (línea DB), para los cromosomas II y III, ambos conteniendo marcadores dominantes que se expresan 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. 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 al transgen y ambos marcadores de la línea DB simultáneamente. Para definir en qué cromosoma autosómico se encuentra la inserción se realiza un segundo cruzamiento, donde los machos de la F1 que contienen el elemento P son cruzados nuevamente por hembras DB. En la progenie de este segundo cruzamiento (F2) 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 el elemento P, mientras que co-existirá con el marcador del cromosoma en el que no se ha insertado.

8- Recombinación homóloga

En *Drosophila* la recombinación meiótica ocurre únicamente en las gametas femeninas. 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 doble heterocigotas para los dos elementos a recombinar, para luego cruzarlas con machos conteniendo un cromosoma balanceador del cromosoma de interés. De la progenie, se recuperan machos individuales balanceados, a los que se les analiza la presencia de ambas entidades a recombinar. Este análisis depende en cada caso de cuáles son las entidades a recombinar. Por ejemplo, cuando las dos entidades a recombinar son elementos P tienen que portan el gen *mini-white*⁺ como marcador, las moscas recombinantes se identifican por la sumatoria del color de ojos de cada uno de los elementos P individuales. En cambio, cuando un elemento a recombinar es una mutación letal

en homocigosis, la identificación se realiza mediante ensayos de letalidad por retrocruzas contra la línea mutante original.

9- Mantenimiento de Stocks

Las líneas de *Drosophila* utilizadas en los experimentos de esta tesis, se mantuvieron en medio de crecimiento estándar preparado a base de harina de maíz, agar, levadura, sacarosa, Nipagin y ácido propiónico (Ashburner, 1989). Los stocks se mantuvieron en viales de vidrio de 2,5 cm de diámetro y 15 cm de alto. Para la amplificación de las líneas de interés, se utilizaron botellas con mayor capacidad (aproximadamente 250 cm³) 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 incubarlos por períodos cortos a 37°C (condiciones de *heat shock*) para diferentes tratamientos. Para llevar a cabo los cruzamientos, hembras vírgenes (con menos de 6 horas de desarrollo a 25°C) y machos se separaron bajo la lupa sobre una plataforma gaseada con CO₂ que las mantiene anestesiadas. 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.

10- Recolección sincronizada de embriones y tratamientos de hipoxia

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. La hipoxia se aplicó a los embriones regulando las proporciones de oxígeno y nitrógeno en un incubador Forma Scientific 3131, a 25°C.

11- Inmunofluorescencia de embriones

Se utilizaron los anticuerpos primarios: anti-Sima (1/300) generado en ratas (Bacon y col., 1998), anti-Tgo (1/100) (monoclonal) (Ward y col., 1998), y anti-Engrailed (1/10) monoclonal (Molecular Probes). Todos los anticuerpos secundarios utilizados (i.e. conjugados a Cy2 y Cy3) fueron de Jackson Laboratories. Los embriones se visualizaron por microscopía de fluorescencia o microscopía 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 decorionados en una solución de hipoclorito de sodio 2.5% (lavandina comercial), filtrados y enjuagados con agua destilada y luego transferidos a un tubo

ependorf donde fueron fijados en una solución 1:1 heptano: fijador [3.7% formaldehído en PT] con agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, el fijador (fase inferior) fue reemplazado por metanol y 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 5 minutos en PT. Luego, se bloquearon en 10% de albúmina sérica bovina (BSA) en PT por 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.

12- Ensayo de actividad β -Galactosidasa en embriones

12.1- CPRG

Para los ensayos cuantitativos de actividad β -galactosidasa se procedió según Zwiebel y col, (1991). Los embriones provenientes de una placa de ovipuesta sincronizada fueron homogeneizados en 200µl de buffer de lisis [50mM Tris HCl pH 7.8; 2mM EDTA; 10% glicerol; 2mM DTT; 1% Tritón X-100; 1mM PMSF] en un Potter de vidrio-teflón y el homogenato fue centrifugado a 2500 x g durante 3 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Típicamente, 50µg de extracto de proteínas fueron utilizados en cada ensayo por triplicado. La reacción enzimática se llevó a cabo incubando 20µl del extracto con 180µl de buffer de reacción [80mM Na₃PO₄ pH7.3; 102mM β -mercaptoetanol; 9mM MgCl₂] conteniendo 4mM Rojo Clorofenol β -D-galactopiranosido (CPRG) (Roche Diagnostics, Mannheim) a 37°C en oscuridad y se midió la absorbancia a 550nm a distintos tiempos. La acumulación del sustrato resultó lineal a lo largo del período de incubación. Una vez chequeada la progresión lineal de la reacción, se utilizó el valor de la pendiente para la comparación entre las distintas condiciones.

12.2- X gal

Para analizar la activación del reportero transcripcional inducible por hipoxia en líneas transgénicas, se determinó la actividad β -galactosidasa in situ utilizando X-gal como sustrato (5-bromo-4cloro-3indolyl β -D-galactopiranosido) (Simon y col., 1985), a partir de embriones

colectados en ovipuestas nocturnas. A ese fin, los embriones fueron decorionados con lavandina durante 1 minuto y fijados 15 minutos con glutaraldehído 0.5% en PBS. A continuación, los embriones fueron lavados con PT (0.1% Tritón X-100 en PBS), luego de lo cual se agregó solución de tinción (5mM K_4Fe^{+2} , 5mM K_4Fe^{+3} y 1mg/ml X-gal en PT); finalmente se incubó a 37°C durante toda la noche y se detuvo la reacción por dilución con buffer PT. Finalmente, los embriones se montaron en glicerol 80% y se los observó por microscopia de campo claro en un microscopio Olympus BX60F5. Las fotografías se obtuvieron con una cámara digital Olympus D71 conectada al microscopio.

13- Hibridización in situ de RNAs mensajeros

Las sondas para detectar la expresión del gen *fatiga* fueron sintetizadas en presencia de rUTP marcado con Digoxigenina (DIG) (Roche). Como templado, se utilizó un producto de PCR en el que el *primer* reverso contenía el promotor de la RNA Pol T7. El fragmento de PCR fue purificado por columna (GFXTM Amersham Bioscience) y la sonda se sintetizó 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 se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1% conteniendo bromuro de etidio, en un documentador de geles con luz UV. El producto de reacción se precipitó en etanol (volumen final de 300µl) con 80mM LiCl, 5mM EDTA y 0.1mg/ml tRNA y se resuspendió finalmente en 10µl H₂O DEPC para su almacenamiento a 20°C.

Embriones de los genotipos *en.Gal4/UAS.Sima*, *en.Gal4/UAS.SimaAHLH*, *en.Gal4/UAS.SimaL101A* y *en.Gal4/UAS.SimaM115A* fueron decorionados y fijados en un tubo *ependorf* 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 de lo cual 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, 50µg/ml heparina, 0.1% Tween 20), a la que se le agregó 1mg/ml de tRNA (Sigma) y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón (Sigma). Los embriones se prehibridizaron durante 1 hora (mínimo) en solución de hibridización 100% a 50°C con agitación y luego se hibridizaron en 100 µl de solución de hibridización conteniendo la sonda (1µl de sonda marcada en 100µl de solución), durante toda la noche a 50°C con agitación. Los embriones se lavaron una vez

durante 10 minutos en 750µl 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% 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) diluído 1/3000 a 4°C durante toda la noche. Luego de dos lavados con PTW, los embriones fueron incubados con 250µl de solución de tinción (100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris 9.5, 0.1% Tween 20 en H₂O DEPC) conteniendo 5µl 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 fue detenida transfiriendo los embriones a PTW. Los embriones fueron lavados dos veces en PTW durante 10 minutos y finalmente se los incubó 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.

14- Ensayo de re-oxigenación

Los embriones que sobre-expresan Sima fueron expuestos a una atmósfera de 1% de oxígeno durante cuatro horas, condición en la cual todos los embriones presentan a Sima localizada en el núcleo. Luego, los embriones fueron transferidos nuevamente a la condición de normoxia y fijados a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 45 minutos) luego de la re-oxigenación. La localización subcelular de Sima para cada tiempo y para cada estadio del desarrollo embrionario se determinó por inmunofluorescencia anti Sima.

15- Análisis Estadístico

15.1- Análisis de la localización subcelular de las construcciones EGFP en células S2 de Drosophila

El análisis cuantitativo de la localización subcelular de las diferentes construcciones de EGFP fue realizado en un microscopio Confocal (Carl Zeiss, LSM5, Pascal) midiendo la intensidad promedio de fluorescencia en el núcleo (N) y en el citoplasma (C), determinando luego la relación núcleo:citoplasma (N:C) (Roth y col., 2003). El análisis estadístico se realizó mediante el test “t-Test” de dos colas asumiendo igual varianza, con N>21.

15.2- Análisis de la localización subcelular de variantes de Sima en embriones de Drosophila

15.2.1- 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 excluye 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 contaron como mínimo 30 embriones para cada condición (i.e. concentración de oxígeno o estadios embrionarios) y luego, se calculó el porcentaje de embriones asignados a cada categoría; las distribuciones entre categorías para los distintos genotipos fueron comparadas mediante el test de “Chi-cuadrado (χ^2)”.

15.2.2- Ensayos de re-oxigenación

Para los ensayos de re-oxigenación se analizaron tres muestras independientes por genotipo y por condición (i.e. 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:

A) *Test de Kaplan-Meyer*: fue utilizado para analizar si existe diferencia 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.

B) *Tiempo Medio (TM)*: definido como el tiempo luego de la re-oxigenación para el cual el 50% de los embriones exportaron a Sima del núcleo, pasando de ser clasificados como nucleares a ser clasificado como ubicuos o citoplasmáticos. Este dato es obtenido a partir de la ecuación de la curva que mejor ajusta a los datos para una condición dada.

16- Experimentos de Doble Híbrido

16.1- Cepas de levadura

Se utilizaron las cepas **EGY42**: MAT-a ura3 trp1 his3 leu2 y **EGY48**: MAT- α ura3 trp1 his3 leu2 :: LexA6op-LEU2

16.2- Cultivo de las levaduras

El cultivo de *S. cerevisiae* se realizó a 30°C, con agitación orbital (220 r.p.m.) en el caso de los cultivos líquidos, en medio rico YPD o en medio mínimo YNB con los suplementos necesarios según el caso (100 mg/l de leucina, 20 mg/l de uracilo, 20 mg/l de triptofano, 20 mg/l de histidina).

16.3- Transformación de las levaduras

Para la transformación de las levaduras se utilizó el método del acetato de litio según (Ito y col., 1983), con las modificaciones introducidas por (Gietz y col., 1995). La selección de los transformantes se realizó en placas con medio mínimo YNB (-Ura -Trp -His -Leu) (BIO 101

Systems) complementado con los aminoácidos correspondientes en función del marcador de cada plásmido (100 mg/l de leucina, 20 mg/l de uracilo, 20 mg/l de triptofano, 20 mg/l de histidina).

REFERENCIAS

- Andrade, M.A. and Bork, P. (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet*, 11, 115-116.
- Andrade, M.A., Petosa, C., O'Donoghue, S.I., Muller, C.W. and Bork, P. (2001) Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J Mol Biol*, 309, 1-18.
- Antonsson, C., Arulampalam, V., Whitelaw, M.L., Pettersson, S. and Poellinger, L. (1995) Constitutive function of the basic helix-loop-helix/PAS factor Arnt. Regulation of target promoters via the E box motif. *J Biol Chem*, 270, 13968-13972.
- 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.
- Arquier, N., Vigne, P., Duplan, E., Hsu, T., Therond, P.P., Frelin, C. and D'Angelo, G. (2006) Analysis of the hypoxia-sensing pathway in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J*, 393, 471-480.
- Askjaer, P., Bachi, A., Wilm, M., Bischoff, F.R., Weeks, D.L., Ogniewski, V., Ohno, M., Niehrs, C., Kjems, J., Mattaj, I.W. and Fornerod, M. (1999) RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Mol Cell Biol*, 19, 6276-6285.
- Aso, T., Yamazaki, K., Aigaki, T. and Kitajima, S. (2000) *Drosophila* von Hippel-Lindau tumor suppressor complex possesses E3 ubiquitin ligase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 276, 355-361.
- Ayers, S.D., Nedrow, K.L., Gillilan, R.E. and Noy, N. (2007) Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPARgamma by FABP4. *Biochemistry*, 46, 6744-6752.
- Bacon, N.C., Wappner, P., O'Rourke, J.F., 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.
- Bayliss, R., Littlewood, T. and Stewart, M. (2000) Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell*, 102, 99-108.
- Bayliss, R., Littlewood, T., Strawn, L.A., Wenthe, S.R. and Stewart, M. (2002) GLFG and FxFG nucleoporins bind to overlapping sites on importin-beta. *J Biol Chem*, 277, 50597-50606.
- 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.
- Bischoff, F.R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. and Ponstingl, H. (1994) RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 2587-2591.
- 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.
- Brand, A.H. and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a 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.
- Campana, W.M., Myers, R.R. and Rearden, A. (2003) Identification of PINCH in Schwann cells and DRG neurons: shuttling and signaling after nerve injury. *Glia*, 41, 213-223.

- Capriotti, E., Fariselli, P., Calabrese, R. and Casadio, R. (2005a) Predicting protein stability changes from sequences using support vector machines. *Bioinformatics*, 21 Suppl 2, ii54-58.
- Capriotti, E., Fariselli, P. and Casadio, R. (2005b) I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res*, 33, W306-310.
- Carroll, V.A. and Ashcroft, M. (2006) Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res*, 66, 6264-6270.
- Centanin, L., Dekanty, A., Romero, N.M., Irisarri, M., Gorr, T.A. and Wappner, P. (2008) Cell autonomy of HIF effects in *Drosophila*: Tracheal cells sense hypoxia terminal branch sprouting. *Dev Cell*, en presa.
- 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.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. and Muller, C.W. (1999) Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature*, 399, 221-229.
- 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.
- Conti, E. and Kuriyan, J. (2000) Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure*, 8, 329-338.
- Conti, E., Muller, C.W. and Stewart, M. (2006) Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Struct Biol*, 16, 237-244.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. and Kuriyan, J. (1998) Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*, 94, 193-204.
- Crews, S.T. and Fan, C.M. (1999) Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr Opin Genet Dev*, 9, 580-587.
- Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T. and Matunis, M.J. (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 158, 915-927.
- Chook, Y.M. and Blobel, G. (1999) Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature*, 399, 230-237.
- Chook, Y.M., Jung, A., Rosen, M.K. and Blobel, G. (2002) Uncoupling Kapbeta2 substrate dissociation and ran binding. *Biochemistry*, 41, 6955-6966.
- Chun, Y.S., Kim, M.S. and Park, J.W. (2002) Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci*, 17, 581-588.
- 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.
- del Peso, L., Castellanos, M.C., Temes, E., Martin-Puig, S., Cuevas, Y., Olmos, G. and Landazuri, M.O. (2003) The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J Biol Chem*, 278, 48690-48695.
- Depping, R., Steinhoff, A., Schindler, S.G., Friedrich, B., Fagerlund, R., Metzen, E., Hartmann, E. and Kohler, M. (2008) Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta*.
- Devos, D., Dokudovskaya, S., Williams, R., Alber, F., Eswar, N., Chait, B.T., Rout, M.P. and Sali, A. (2006) Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2172-2177.
- Dingwall, C. and Laskey, R.A. (1991) Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci*, 16, 478-481.

- Dworetzky, S.I. and Feldherr, C.M. (1988) Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol*, 106, 575-584.
- Eguchi, H., Ikuta, T., Tachibana, T., Yoneda, Y. and Kawajiri, K. (1997) A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J Biol Chem*, 272, 17640-17647.
- 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.
- Emmons, R.B., Duncan, D., Estes, P.A., Kiefel, P., Mosher, J.T., Sonnenfeld, M., Ward, M.P., Duncan, I. and Crews, S.T. (1999) The spineless-aristapedia and tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in *Drosophila*. *Development*, 126, 3937-3945.
- Enenkel, C., Blobel, G. and Rexach, M. (1995) Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem*, 270, 16499-16502.
- Engel, K., Kotlyarov, A. and Gaestel, M. (1998) Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *Embo J*, 17, 3363-3371.
- Engelsma, D., Bernad, R., Calafat, J. and Fornerod, M. (2004) Supraphysiological nuclear export signals bind CRM1 independently of RanGTP and arrest at Nup358. *Embo J*, 23, 3643-3652.
- Englmeier, L., Fornerod, M., Bischoff, F.R., Petosa, C., Mattaj, I.W. and Kutay, U. (2001) RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. *EMBO Rep*, 2, 926-932.
- 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.
- Fanara, P., Hodel, M.R., Corbett, A.H. and Hodel, A.E. (2000) Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. *J Biol Chem*, 275, 21218-21223.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W. and Luhrmann, R. (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, 82, 475-483.
- Fontes, M.R., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R.I. and Kobe, B. (2003) Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. *J Biol Chem*, 278, 27981-27987.
- Fontes, M.R., Teh, T. and Kobe, B. (2000) Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol*, 297, 1183-1194.
- Fornerod, 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.
- Fried, H. and Kutay, U. (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci*, 60, 1659-1688.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11, 355-360.
- Gilchrist, D. and Rexach, M. (2003) Molecular basis for the rapid dissociation of nuclear localization signals from karyopherin alpha in the nucleoplasm. *J Biol Chem*, 278, 51937-51949.

- 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.
- Golemis, E.a.A., P.D. (2001) Molecular Cloning - A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*
- Gorlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E. and Prehn, S. (1995) Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol*, 5, 383-392.
- Gorlich, D. and Mattaj, I.W. (1996) Nucleocytoplasmic transport. *Science*, 271, 1513-1518.
- 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 HIF α homolog gene similar. *J Biol Chem*, 279, 36048-36058.
- Gothie, E., Richard, D.E., Berra, E., Pages, G. and Pouyssegur, J. (2000) Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem*, 275, 6922-6927.
- Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R.H., Kvietikova, I., fhitelaw, 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., Milligan, J. and Huang, L.E. (2001) Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1 α -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine. *J Biol Chem*, 276, 3550-3554.
- Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L. and Bradfield, C.A. (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr*, 7, 205-213.
- Harreman, M.T., Hodel, M.R., Fanara, P., Hodel, A.E. and Corbett, A.H. (2003) The auto-inhibitory function of importin α is essential in vivo. *J Biol Chem*, 278, 5854-5863.
- 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.
- Hirota, K. and Semenza, G.L. (2005) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 610-616.
- Hodel, A.E., Harreman, M.T., Pulliam, K.F., Harben, M.E., Holmes, J.S., Hodel, M.R., Berland, K.M. and Corbett, A.H. (2006) Nuclear localization signal receptor affinity correlates with in vivo localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 281, 23545-23556.
- Hodel, M.R., Corbett, A.H. and Hodel, A.E. (2001) Dissection of a nuclear localization signal. *J Biol Chem*, 276, 1317-1325.
- Hon, W.C., Wilson, M.I., Harlos, K., Claridge, T.D., Schofield, C.J., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J., Stuart, D.I. and Jones, E.Y. (2002) Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL. *Nature*, 417, 975-978.
- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S.M. and Lee, F.S. (2002) Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem*, 277, 39792-39800.
- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M. and Bunn, H.F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7987-7992.
- Huang, Z.J., Edery, I. and Rosbash, M. (1993) PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. *Nature*, 364, 259-262.
- Hutten, S. and Kehlenbach, R.H. (2007) CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol*, 17, 193-201.

- Ikuta, T., Tachibana, T., Watanabe, J., Yoshida, M., Yoneda, Y. and Kawajiri, K. (2000) Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biochem*, 127, 503-509.
- Ikuta, T., Watanabe, J. and Kawajiri, K. (2002) Characterization of the LxxLL motif in the aryl hydrocarbon receptor: effects on subcellular localization and transcriptional activity. *J Biochem*, 131, 79-85.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, 153, 163-168.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. and Kaelin, W.G., Jr. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 292, 464-468.
- Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W. and Gorlich, D. (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J*, 16, 6535-6547.
- 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- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292, 468-472.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J. and Kim, K.W. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 111, 709-720.
- 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 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*, 272, 19253-19260.
- Jiang, L. and Crews, S.T. (2003) The Drosophila dysfusion basic helix-loop-helix (bHLH)-PAS gene controls tracheal fusion and levels of the trachealess bHLH-PAS protein. *Mol Cell Biol*, 23, 5625-5637.
- Jiang, L. and Crews, S.T. (2006) Dysfusion transcriptional control of Drosophila tracheal migration, adhesion, and fusion. *Mol Cell Biol*, 26, 6547-6556.
- Jin, J., Anthopoulos, N., Wetsch, B., Binari, R.C., Isaac, D.D., Andrew, D.J., Woodgett, J.R. and Manoukian, A.S. (2001) Regulation of Drosophila tracheal system development by protein kinase B. *Dev Cell*, 1, 817-827.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. and Smith, A.E. (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39, 499-509.
- Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., 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-1 α . *Embo J*, 17, 6573-6586.
- Kallio, P.J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J. and Poellinger, L. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 5667-5672.
- Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y. and Poellinger, L. (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 274, 6519-6525.
- Kallstrom, H., Lindqvist, A., Pospisil, V., Lundgren, A. and Rosenthal, C.K. (2005) Cdc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import. *Exp Cell Res*, 303, 89-100.
- Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R.C. and Conaway, J.W. (2000) Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10430-10435.

- Kehlenbach, R.H., Assheuer, R., Kehlenbach, A., Becker, J. and Gerace, L. (2001) Stimulation of nuclear export and inhibition of nuclear import by a Ran mutant deficient in binding to Ran-binding protein 1. *J Biol Chem*, 276, 14524-14531.
- Ko, H.P., Okino, S.T., Ma, Q. and Whitlock, J.P., Jr. (1996) Dioxin-induced CYP1A1 transcription in vivo: the aromatic hydrocarbon receptor mediates transactivation, enhancer-promoter communication, and changes in chromatin structure. *Mol Cell Biol*, 16, 430-436.
- Kobe, B. (1999) Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol*, 6, 388-397.
- Kruus, E., Thumfort, P., Tang, C. and Wingreen, N.S. (2005) Gibbs sampling and helix-cap motifs. *Nucleic Acids Res*, 33, 5343-5353.
- Kuersten, S., Ohno, M. and Mattaj, I.W. (2001) Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol*, 11, 497-503.
- Kutay, U. and Guttinger, S. (2005) Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol*, 15, 121-124.
- la Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F.M. and Brunak, S. (2003) NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res*, 31, 393-396.
- la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. and Brunak, S. (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel*, 17, 527-536.
- 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, S.J., Matsuura, Y., Liu, S.M. and Stewart, M. (2005) Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature*, 435, 693-696.
- Lindsay, M.E., Holaska, J.M., Welch, K., Paschal, B.M. and Macara, I.G. (2001) Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *J Cell Biol*, 153, 1391-1402.
- Liu, L., Chen, G., Ji, X. and Gao, G. (2004) ZAP is a CRM1-dependent nucleocytoplasmic shuttling protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 321, 517-523.
- 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 (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene*, 20, 1435-1444.
- Lupas, A. (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*, 21, 375-382.
- Ma, E. and Haddad, G.G. (1999) Isolation and characterization of the hypoxia-inducible factor 1beta in *Drosophila melanogaster*. *Brain Res Mol Brain Res*, 73, 11-16.
- Macara, I.G. (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65, 570-594, table of contents.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, 88, 97-107.
- Mahon, P., Hirota, K. and Semenza, G.L. (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1a and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes dev.*, 15, 2675-2686.
- Martinez-Arias, A.a.B., M. (1993) The Development of the *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*
- Masson, N. and Ratcliffe, P.J. (2003) HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. *J Cell Sci*, 116, 3041-3049.

- 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- α chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J*, 20, 5197-5206.
- Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (1993) 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. *Nature*, 399, 271-275.
- Melchior, F. and Gerace, L. (1998) Two-way trafficking with Ran. *Trends Cell Biol*, 8, 175-179.
- 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 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci*, 116, 1319-1326.
- Michel, G., Minet, E., Ernest, I., Roland, I., Durant, F., Remacle, J. and Michiels, C. (2000) A model for the complex between the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its consensus DNA sequence. *J Biomol Struct Dyn*, 18, 169-179.
- Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Raes, M. and Michiels, C. (2001) Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med*, 31, 847-855.
- Morgenstern, B. and Atchley, W.R. (1999) Evolution of bHLH transcription factors: modular evolution by domain shuffling? *Mol Biol Evol*, 16, 1654-1663.
- Morii, K., Tanaka, R., Washiyama, K., Kumanishi, T. and Kuwano, R. (1993) Expression of vascular endothelial growth factor in capillary hemangioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 194, 749-755.
- Moroianu, J., Blobel, G. and Radu, A. (1995) Previously identified protein of uncertain function is karyopherin α and together with karyopherin β docks import substrate at nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 2008-2011.
- 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 α and Drosophila single-minded. *Gene*, 172, 249-254.
- Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A., Jr. and Crews, S.T. (1991) The Drosophila single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell*, 67, 1157-1167.
- Nemergut, M.E., Mizzen, C.A., Stukenberg, T., Allis, C.D. and Macara, I.G. (2001) Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science*, 292, 1540-1543.
- Nigg, E.A. (1997) Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*, 386, 779-787.
- O'Keefe, K., Li, H. and Zhang, Y. (2003) Nucleocytoplasmic shuttling of p53 is essential for MDM2-mediated cytoplasmic degradation but not ubiquitination. *Mol Cell Biol*, 23, 6396-6405.
- Oberkovitz, G., Regev, L. and Gross, A. (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of BID is involved in regulating its activities in the DNA-damage response. *Cell Death Differ*, 14, 1628-1634.
- Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V. and Kaelin, W.G. (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*, 2, 423-427.
- Ohshiro, T. and Saigo, K. (1997) Transcriptional regulation of breathless FGF receptor gene by binding of TRACHEALESS/dARNT heterodimers to three central midline elements in Drosophila developing trachea. *Development*, 124, 3975-3986.

- Paraskeva, E., Izaurralde, E., Bischoff, F.R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Luhrmann, R. and Gorlich, D. (1999) CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol*, 145, 255-264.
- Pemberton, L.F. and Paschal, B.M. (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*, 6, 187-198.
- Perander, M., Bjorkoy, G. and Johansen, T. (2001) Nuclear import and export signals enable rapid nucleocytoplasmic shuttling of the atypical protein kinase C lambda. *J Biol Chem*, 276, 13015-13024.
- Petosa, C., Schoehn, G., Askjaer, P., Bauer, U., Moulin, M., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Baudin, F., Mattaj, I.W. and Muller, C.W. (2004) Architecture of CRM1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Mol Cell*, 16, 761-775.
- Pollenz, R.S. and Barbour, E.R. (2000) Analysis of the complex relationship between nuclear export and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene regulation. *Mol Cell Biol*, 20, 6095-6104.
- Poon, I.K. and Jans, D.A. (2005) Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic*, 6, 173-186.
- Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., 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.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S.W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 21, 267-271.
- 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.
- Riddick, G. and Macara, I.G. (2005) A systems analysis of importin- α - β mediated nuclear protein import. *J Cell Biol*, 168, 1027-1038.
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J. and Yaffe, M.B. (1999) Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell*, 4, 153-166.
- 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.
- Romero, N.M., Dekanty, A. and Wappner, P. (2007) Cellular and developmental adaptations to hypoxia: a Drosophila perspective. *Methods Enzymol*, 435, 123-144.
- Romero, N.M., Irisarri, M., Roth, P., Cauerrhff, A., Samakovlis, C. and Wappner, P. (2008) Regulation of the Drosophila HIF-a protein Sima by CRM1 dependent nuclear export. *Mol Cell Biol*, en prensa.
- 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.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B.T. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*, 148, 635-651.
- 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.
- Samakovlis, C., Hacohen, N., Manning, G., Sutherland, D.C., Guillemin, K. and Krasnow, M.A. (1996) Development of the Drosophila tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development*, 122, 1395-1407.
- Schneider, T.D. and Stephens, R.M. (1990) Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res*, 18, 6097-6100.

- Schofield, C.J. and Ratcliffe, P.J. (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 617-626.
- Seki, T., Hayashi, N. and Nishimoto, T. (1996) RCC1 in the Ran pathway. *J Biochem*, 120, 207-214.
- Semenza, G.L. (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE*, 2007, cm8.
- Semenza, G.L., Neufeldt, 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. 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.
- Simon, J.A., Sutton, C.A., Lobell, R.B., Glaser, R.L. and Lis, J.T. (1985) Determinants of heat shock-induced chromosome puffing. *Cell*, 40, 805-817.
- Sodhi, C.P., Battle, D. and Sahai, A. (2000) Osteopontin mediates hypoxia-induced proliferation of cultured mesangial cells: role of PKC and p38 MAPK. *Kidney Int*, 58, 691-700.
- Sogawa, K., Nakano, R., Kobayashi, A., Kikuchi, Y., Ohe, N., Matsushita, N. and Fujii-Kuriyama, Y. (1995) Possible function of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) homodimer in transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1936-1940.
- 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.
- 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.
- Strawn, L.A., Shen, T., Shulga, N., Goldfarb, D.S. and Wentz, S.R. (2004) Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. *Nat Cell Biol*, 6, 197-206.
- Sutter, C.H., Laughner, E. and Semenza, G.L. (2000) Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4748-4753.
- Tachibana, T., Imamoto, N., Seino, H., Nishimoto, T. and Yoneda, Y. (1994) Loss of RCC1 leads to suppression of nuclear protein import in living cells. *J Biol Chem*, 269, 24542-24545.
- Takahashi, A., Sasaki, H., Kim, S.J., Tobisu, K., Kakizoe, T., Tsukamoto, T., Kumamoto, Y., Sugimura, T. and Terada, M. (1994) Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Res*, 54, 4233-4237.
- 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.
- Tran, E.J. and Wentz, S.R. (2006) Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell*, 125, 1041-1053.
- Vetter, I.R., Arndt, A., Kutay, U., Gorlich, D. and Wittinghofer, A. (1999) Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 A resolution. *Cell*, 97, 635-646.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. and Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5510-5514.

- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993) 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. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270, 1230-1237.
- Wang, Y., Kakinuma, N., Zhu, Y. and Kiyama, R. (2006) Nucleo-cytoplasmic shuttling of human Kank protein accompanies intracellular translocation of beta-catenin. *J Cell Sci*, 119, 4002-4010.
- 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.
- Weis, K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, 112, 441-451.
- Welch, K., Franke, J., Kohler, M. and Macara, I.G. (1999) RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin-alpha3. *Mol Cell Biol*, 19, 8400-8411.
- Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y. and Taylor, S.S. (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell*, 82, 463-473.
- Wheelock, M.J. and Johnson, K.R. (2003) Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 207-235.
- Wiener, C.M., Booth, G. and Semenza, G.L. (1996) In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 225, 485-488.
- Wilk, R., Weizman, I. and Shilo, B.Z. (1996) tracheless encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes Dev*, 10, 93-102.
- Xiao, Z., Watson, N., Rodriguez, C. and Lodish, H.F. (2001) Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *J Biol Chem*, 276, 39404-39410.
- Yagisawa, H. (2006) Nucleocytoplasmic shuttling of phospholipase C-delta1: a link to Ca²⁺. *J Cell Biochem*, 97, 233-243.
- Yashiroda, Y. and Yoshida, M. (2003) Nucleo-cytoplasmic transport of proteins as a target for therapeutic drugs. *Curr Med Chem*, 10, 741-748.
- Yokoyama, N., Hayashi, N., Seki, T., Pante, N., Ohba, T., Nishii, K., Kuma, K., Hayashida, T., Miyata, T., Aebi, U. and et al. (1995) A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature*, 376, 184-188.
- Yu, A.Y., Frid, M.G., Shimoda, L.A., Wiener, C.M., Stenmark, K. and Semenza, G.L. (1998) Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol*, 275, L818-826.
- Zelzer, E., Wappner, P. and Shilo, B.Z. (1997) The PAS domain confers target gene specificity of *Drosophila* bHLH/PAS proteins. *Genes Dev*, 11, 2079-2089.
- Zhang, Y. and Xiong, Y. (2001) A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science*, 292, 1910-1915.
- Zhao, X., Gan, L., Pan, H., Kan, D., Majeski, M., Adam, S.A. and Unterman, T.G. (2004) Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *Biochem J*, 378, 839-849.
- Zheng, X., Ruas, J.L., Cao, R., Salomons, F.A., Cao, Y., Poellinger, L. and Pereira, T. (2006) Cell-type-specific regulation of degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha: role of subcellular compartmentalization. *Mol Cell Biol*, 26, 4628-4641.