



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Mecanismos de acción de RSUME sobre la función
del supresor tumoral VHL y su impacto en el
desarrollo del síndrome VHL asociados a la
desregulación de HIF**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Lic. Lucas Tedesco

Director: Dr. Eduardo Arzt

Consejero de estudios: Dr. Eduardo Arzt

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA) -
CONICET- Instituto Partner de la Sociedad Max Planck

Buenos Aires

2018

Agradecimientos

La Tesis de Doctorado es un camino de aprendizaje y crecimiento que no es posible hacerlo solo. Desde mis inicios en el laboratorio hasta hoy mucha gente ha estado a mi lado acompañándome y ha dejado algo en mí que me permitió llegar a este punto.

Muchas gracias Archie por la confianza y el apoyo durante estos años de trabajo juntos. Desde mis inicios en la Tesis de Licenciatura, hasta la posibilidad de seguir mi Tesis de Doctorado, siempre me has llevado a mirar un problema desde distintos lados, y así es que hemos encontrado solución a infinidad de ellos.

En mi camino a convertirme es uno de los “viejos del laboratorio” he compartido con mucha gente.

A mis compañeros y amigos de laboratorio del pasado y los actuales, gracias por la ayuda en los problemas del día a día de mesada, en las discusiones que sirvieron para llevar adelante este proyecto y más que nada, por la ayuda en los momentos que se necesitaba un empujón. Con todo lo compartido he hecho grandes amigos, que han sabido entender mi particular simpatía.

“Braulios”, “Viejos Archies”, “Mushi”. Claramente el laboratorio se ha poblado y con ello, la gente que llegó hacen que el siguiente paso no sea tan fácil como pensaba. Quedan mis millones de frases anotadas, algún que otro invento a lo MacGyver, anécdotas por mil rincones del IBioBA, pero lo más importante, mi lámpara, cuiden mi lámpara.

David y Belén, desde que se acoplaron a VHL-RSUME han aportado esa energía necesaria para seguir adelante sin parar, una nueva mirada para discutir los resultados y más que nada, la tranquilidad de que lo que sigue queda en excelentes manos.

A mis amigos de la Facultad, gracias por poder contar con ustedes siempre. Nos conocemos hace mucho y hemos transitado por esto juntos. Desde compartir dudas experimentales hasta “la pinta” de emergencia para relajar. Gracias por el sinfín de anécdotas que año a año replotamos en la bagna cauda oficial.

Los de Comodoro. Reptilia, les agradezco por la incondicionalidad después de tanto tiempo. Por poner cara de que entienden de que es mi Tesis cada vez que les cuento. Ahora con un poco más de tiempo voy a poder cumplir mi gran deuda con uds, “El Quitapena”. Finalmente van a estar en lo correcto cuando me traten de Dr.

“Lacantinadenorma”. Estamos todos repartidos por distintos lugares, pero siempre cerca. La carcajada en el momento justo, los recuerdos de las mil anécdotas juntos y el apoyo constante, hacen que a pesar de no vernos, estén conmigo.

A mi familia, por bancarme en todo sin importar lo que sea. Por inculcarme que uno tiene que seguir lo que a uno le apasione. “Yo hice todo, yo puedo”, un mantra que heredé, que me ha ayudado siempre a seguir adelante. Me dan la energía suficiente para vencer mis trabas y para animarme a más.

Finalmente Anita. Ya hace rato que formamos una linda familia. Cada uno ha estado para apoyar las decisiones del otro, poniendo el hombro y dispuesto a aguantar la que se venga. Tengo la suerte que encontré en una amiga, colega, compañera y más. Gracias por darme el empujón que necesité durante estos años y por hacerme entender mis logros. Se viene una nueva etapa y ansío que la transitemos juntos.

Tabla de contenido

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	4
Introducción	6
I. Importancia del Oxígeno: Respuesta adaptativa a la Hipoxia celular.....	7
II. Respuesta adaptativa a la hipoxia	7
III. Factores Inducibles por Hipoxia (HIF).....	9
III.1 Regulación de las isoformas de HIF- α	11
III.2 Modificaciones post-traduccionales que regulan la actividad y estabilidad de HIF	12
III.2.1 Hidroxilación de HIF en prolinas: regulación de estabilidad	13
III.2.2 Hidroxilación de HIF en asparagina: regulación de la actividad transcripcional .	14
III.2.3 Ubiquitinación: regulación de estabilidad	14
III.2.4 SUMOilación; regulación de estabilidad y actividad	18
III.2.5 Otras Modificaciones postraduccionales sobre HIF	20
IV. Supresor Tumoral von Hippel-Lindau.....	20
V. RSUME o RWDD3	21
V.1 RSUME como modulador positivo de la sumoilación	23
V.2 RSUME en la respuesta adaptativa a hipoxia por HIF.....	24
VI. HIF como regulador maestro en la progresión tumoral.....	25
VI.1 Angiogénesis	26
VII. Desregulación de los niveles de HIF, Síndrome von Hippel-Lindau	27
VII.1 Seguimiento clínico y estrategias terapéuticas	31
VII.2 Antecedentes del efecto de RSUME sobre VHL y HIF	33
Objetivos.....	36
Objetivo General I:	37
Objetivo General II:	37
Materiales y Métodos	38
I. Aparatos o dispositivos especiales	39
II. Anticuerpos, estímulos y productos relacionados	39
II.1 Anticuerpos.....	39
II.2 Estímulos y otros reactivos/materiales.....	40
III. Cultivos Celulares, Estímulos y Transfecciones	41
III.1 Líneas Celulares.....	41
III.2 Condiciones de cultivo	41
III.3 Estímulos.....	42
III.4 Transfecciones de células en cultivo.....	42
III.5 Tranfecciones estables	43
IV. Ensayos de Actividad Luciferasa	43

IV.1	Preparación de extractos celulares	43
IV.2	Determinación de la actividad luciferasa	43
IV.3	Determinación de la actividad β -galactosidasa	44
V.	Manejo de plásmidos	44
V.1	Plásmidos utilizados	44
V.2	Preparación de Bacterias Competentes.	46
V.3	Transformación Bacteriana y Aislamiento de Plásmidos	47
V.4	Preparación de Plásmidos a Pequeña Escala o Minipreparaciones.	47
V.5	Preparación de Plásmidos a gran Escala o Maxi-Megapreparaciones.	47
V.6	Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción	48
VI.	Clonado de plásmidos	48
VI.1	Construcción de vectores de expresión Flag-VHL-GFP ShScramble o ShRSUME ...	48
VI.1.1	Obtención de Flag-VHL-GFP conteniendo mutaciones puntuales	49
VI.2	Inserción del cassette de expresión ShRSUME o ShScramble en los plásmido Flag-VHL-GFP	52
VI.2.1	Diseño de primers	52
VI.3	Reacción de Fosfatasa Alcalina de Camarón (SAP)	53
VII.	RNA, transcripción reversa y PCR	53
VII.1	Transcripción reversa	54
VII.2	PCR a tiempo final.....	54
VII.3	PCR en tiempo real o cuantitativa	54
VII.4	Primers utilizados	55
VIII.	Muestras tumorales humanas	55
IX.	Western Blot	55
IX.1	Preparación de los extractos celulares	55
IX.2	Preparación de extractos a partir de muestras de tumores	56
IX.3	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electrotransferencia y revelado.....	56
X.	Ensayos de inmunoprecipitación.....	57
X.1	Ensayo de Co-inmunoprecipitación en tándem	57
XI.	Obtención de proteínas recombinantes	58
XI.1	Pull down de proteínas recombinantes	58
XII.	Ensayo de sumoilación <i>in vitro</i>	59
XIII.	Purificación de Niquel para ensayo de sumoilación.....	59
XIV.	Ensayo de tubulogénesis <i>in vitro</i>	60
XIV.1	Obtención de medios condicionados	60
XIV.2	Formación de túbulos	60
XV.	Ensayos en animales	60
XV.1	Ensayo de angiogénesis <i>in vivo</i>	60

XV.2	Tumorigenesis in vivo.....	61
XVI.	Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia.....	61
XVI.1	Inmunofluorescencia.....	61
XVI.2	Inmunohistoquímica.....	62
XVII.	Análisis estadístico.....	63
	Resultados.....	64
I.	CAPITULO I: RSUME interacciona con VHL e inhibe su función como ligasa de Ubiquitina.....	65
I.1	RSUME actúa sobre VHL inhibiendo su función E3 Ligasa de Ubiquitina.....	65
I.2	RSUME interacciona físicamente con VHL e impacta en la unión VHL-HIF.....	70
I.3	RSUME promueve un aumento en la sumoilación de VHL.....	74
I.4	RSUME actúa sobre HIF independientemente de su acción sobre la sumoilación de VHL.....	77
II.	Capítulo II: RSUME en el contexto de la enfermedad VHL y su impacto en la función de las mutantes de VHL.....	83
II.1	RSUME se expresa en tumores VHL.....	83
II.2	Acción de RSUME sobre las mutantes de VHL.....	86
II.3	MECANISMO DE ACCION DE RSUME SOBRE LAS MUTANTES de VHL.....	89
II.3.1	RSUME promueve la sumoilación de las mutantes puntuales de VHL.....	89
II.3.2	RSUME regula la actividad de las mutantes de RSUME independientemente de su sumoilación.....	91
II.3.3	RSUME interacciona con las mutantes de VHL afectando su unión a HIF-2 α ... 93	
II.4	RSUME impacta en VHL y con ello genera un escenario proangiogénico.....	96
II.5	RESUME está involucrado en la formación de tumores dependientes de la pérdida de función VHL.....	99
	Discusión.....	103
1.	RSUME modula positivamente los niveles de HIF.....	105
1.1.	Efecto de RSUME sobre los niveles de HIF en hipoxia.....	105
1.2.	Acción de RSUME sobre la función de VHL en normoxia.....	105
1.3.	Acción de RSUME sobre las mutantes de VHL.....	108
2.	Mecanismo de acción de RSUME sobre VHL.....	109
2.1.	Caracterización de la interacción entre RSUME y VHL.....	110
2.2.	Acción de RSUME sobre los complejos de VHL.....	110
2.3.	RSUME como modulador de la sumoilación de VHL.....	112
3.	Rol de RSUME en el establecimiento del fenotipo angiogénico tumoral.....	114

Mecanismos de acción de RSUME sobre la función del supresor tumoral VHL y su impacto en el desarrollo del síndrome VHL asociados a la desregulación de HIF

RESUMEN

Los factores HIF son heterodímeros compuestos por dos subunidades, α y β . Mientras que los niveles de HIF- β son constitutivos, la estabilidad y actividad de las subunidades HIF-1 α y HIF-2 α están finamente reguladas por los niveles de O₂: contienen un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) que en normoxia es blanco de hidroxilación. Cuando HIF- α está hidroxilada puede interactuar con el supresor tumoral von Hippel-Lindau (VHL), que conformando un complejo proteico con Elonguina C, Elonguina B, Cullina-2 y Rbx-1 promueve la poliubiquitinación de HIF- α , señal necesaria para su posterior degradación.

El síndrome de VHL es causado por mutaciones en el gen de VHL, que llevan a una inactivación total o parcial de su función y generan que la estabilidad de HIF-1 α y HIF-2 α sea independiente de los niveles de O₂, generando una actividad constitutiva de HIF. La desregulación de las vías dependientes de HIF conduce a la aparición de tumores altamente vascularizados como producto de la desregulación de factores pro-angiogénicos como VEGF. En el síndrome de VHL estos tumores aparecen en el sistema nervioso central y retina (Hemangioblastomas), en la glándula adrenal (Feocromocitomas) y en el riñón (Carcinoma Renal de Células Claras o RCC), entre otros tejidos. Resulta de interés determinar los mecanismos involucrados que en la pérdida de función de las mutantes VHL que promueven el establecimiento de tumores dependientes de VHL-HIF.

Nuestro grupo de trabajo aisló a la proteína RWDD3 o RSUME (*RWD domain-containing protein SUMOylation Enhancer*) que se induce en condiciones de estrés celular y participa a la modificación post-traducciona conocida como sumoilación. En particular, se demostró que RSUME se expresa en hipoxia (HPX) e incrementa la sumoilación de HIF-1 α , aumentando su estabilidad y actividad transcripcional. En normoxia, RSUME aumenta los niveles de HIF-1 α incluso al sobre-expresar VHL, indicando una posible inhibición funcional de RSUME sobre VHL. RSUME se expresa en los tejidos característicos del síndrome. Además, mayores niveles de ARN de RSUME en tumores RCC correlacionan con un peor pronóstico de los pacientes, indicando que RSUME podría ser un marcador a tener en cuenta en el desarrollo de la enfermedad.

El objetivo de esta Tesis fue caracterizar el mecanismo molecular de acción de RSUME sobre el sistema VHL-HIF. En el contexto de la enfermedad VHL, el trabajo se

centró en estudiar la función de RSUME en el establecimiento de tumores VHL analizando su rol y mecanismos de acción sobre la pérdida de función de las mutantes de VHL.

En primer lugar, utilizando un modelo celular que carece de expresión de VHL (la línea celular RCC-786-O) determinamos que RSUME sólo afecta la estabilidad de HIF-1 α y HIF-2 α cuando VHL se expresa ectópicamente. RSUME bloquea la degradación de HIF inhibiendo la ubiquitinación de HIF dependiente de VHL. Confirmando que los efectos de RSUME son directos sobre la función de VHL, observamos que RSUME bloquea la degradación de otros blancos de ubiquitinación de VHL. Determinamos que RSUME y VHL interactúan sin intermediarios. En el contexto celular, RSUME forma un complejo con el dímero VHL-HIF α , que disminuye la interacción de VHL con HIF-1 y 2 α , y así, aumenta la estabilidad de estas últimas.

Dado que RSUME es un potenciador de sumoilación, se determinó que RSUME modula positivamente la sumoilación de VHL tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, observamos que RSUME bloquea la acción de VHL incluso cuando se inhibe la sumoilación general o se usa una mutante no sumoilable de VHL, indicando que la acción de RSUME es independiente de su efecto sobre la sumoilación de VHL.

Luego, analizamos el impacto de RSUME sobre el establecimiento de la enfermedad VHL. Detectamos la expresión proteica de RSUME en muestras tumorales de pacientes VHL, confirmando un posible rol de RSUME en los tumores. Además, determinamos que, a diferencia de VHL salvaje, mutantes de VHL características de la enfermedad son incapaces de inhibir la expresión de RSUME sugiriendo un potencial mecanismo de desregulación de RSUME en el contexto tumoral asociado a VHL. En el estudio de los mecanismos de acción de RSUME, determinamos que la sobreexpresión de RSUME potencia la pérdida de función de las mutantes de VHL, evidenciado por una mayor estabilidad y actividad transcripcional de HIF-2 α . RSUME actúa independientemente de su capacidad de sumoilar a las mutantes de VHL. RSUME se une a las diferentes variantes de VHL, promoviendo una disminución en su interacción con HIF-2 α y en la formación del complejo ECV, aumentando la estabilidad de los blancos de ubiquitinación.

Utilizando clones generados en un modelo celular de la enfermedad de VHL en los que silenciamos la expresión de RSUME, verificamos el rol crítico de RSUME en la pérdida de función de VHL. Menores niveles de RSUME resultaron en una ganancia de función en VHL, lo que se tradujo en una disminución en la vascularización asociada a VEGF y en tumores más pequeños y menos vascularizados.

En conclusión, estudiando la función de RSUME en distintos modelos experimentales y a través de estrategias experimentales complementarias, nuestros resultados evidencian el rol fundamental de RSUME en el síndrome VHL y proponen mecanismos moleculares para explicar la acción de RSUME sobre VHL, enfatizando que RSUME no sólo es un promotor de la sumoilación sino que –como en el caso de VHL- regula a otras proteínas a través de la formación de complejos proteicos que modifican su función.

Palabras Clave: HIF, VHL, Síndrome von Hippel-Lindau, Ubiquitinación, RSUME, RWDD3, Sumoilación, VEGF

Mechanisms of RSUME action on VHL tumor suppressor function and its impact on the development of VHL syndrome associated with the deregulation of HIF

ABSTRACT

HIF factors are heterodimers composed by two subunits, α and β . While HIF- β levels are constitutive, the stability and activity of the HIF-1 α and HIF-2 α are finely regulated by O₂: they contain an oxygen-dependent degradation domain (ODD) that in normoxia is hydroxylated. When HIF- α is hydroxylated it interacts with the tumor suppressor von Hippel-Lindau (VHL), which forms a protein complex with Elongin C, Elongin B, Cullin-2 and Rbx-1 and promotes HIF- α polyubiquitination, necessary for its subsequent degradation. VHL syndrome is caused by mutations in VHL gene, which lead to a total or partial inactivation of its function. As consequence HIF-1 α and HIF-2 α stability become independent of the O₂ levels, generating a constitutive activity of HIF. Overactivation of HIF dependent pathways leads to deregulation of pro-angiogenic factors such as VEGF, causing the appearance of highly vascularized tumors as a result of the. In VHL syndrome these tumors appear in the central nervous system and retina (Hemangioblastoma), in the adrenal gland (Pheochromocytoma) and in the kidney (Clear Renal Cell Carcinoma or RCC), among other tissues. It is of interest to determine the mechanisms involved in the loss of function of the VHL mutants that promote the establishment of VHL-HIF dependent tumors.

Our group isolated the protein RWDD3 or RSUME (RWD domain-containing protein SUMOylation Enhancer), which is induced in cellular stress conditions and participates in the post-translational modification known as sumoylation. In particular, it was shown that RSUME is expressed in hypoxia (HPX) and increases the sumoylation of HIF-1 α , increasing its stability and transcriptional activity. In normoxia, RSUME increases the levels of HIF-1 α even when over-expressing VHL, indicating a possible functional inhibition of RSUME on VHL. RSUME is expressed in the tissues prone to develop VHL syndrome tumors. In addition, higher levels of RSUME RNA in RCC tumors correlate with a worse prognosis in patients, indicating that RSUME could be a marker to be taken into account in the development of the disease.

The objective of this Thesis was to characterize the molecular mechanism of action of RSUME on the VHL-HIF system. In the context of VHL disease, this work has focused on studying the role of RSUME in the establishment of VHL tumors by analyzing the mechanisms of action on the loss of function of VHL mutants.

First, using a cellular model that lacks VHL expression (cell line RCC-786-O) we determined that RSUME only affects the stability of HIF-1 α and HIF-2 α when VHL is ectopically expressed. RSUME blocks the degradation of HIF by inhibiting VHL-

dependent HIF ubiquitination. Confirming that RSUME acts directly on VHL function, we observed that RSUME blocks the degradation of other VHL ubiquitination targets. Additionally, RSUME and VHL interact without intermediaries. In the cellular context, we determined that RSUME forms a complex with the VHL-HIF α dimer and decreases VHL interaction with HIF-1 and 2 α , and thus, increases their stability.

As RSUME is a sumoylation enhancer, here it was determined that RSUME positively modulates VHL sumoylation both *in vitro* and *in vivo*. However, we observed that RSUME blocks the action of VHL even when general sumoylation was inhibited or a non-sumoillable mutant of VHL was used, indicating that the action of RSUME is independent of its effect on VHL sumoylation.

Then, we analyzed the impact of RSUME on the establishment of VHL disease. We detected RSUME protein expression in VHL tumor samples, confirming a possible role of RSUME in these tumors. In addition, we determined that, unlike wild-type VHL, VHL disease mutants were unable to inhibit the expression of RSUME, suggesting a potential deregulation mechanism of RSUME in the tumor context associated with VHL. In the study of possible mechanisms of action of RSUME on VHL mutants, we established that RSUME overexpression potentiates their loss of function, evidenced by increased stability and transcriptional activity of HIF-2. RSUME binds to the VHL mutants, promoting a decrease in its interaction with HIF-2 α and ECV complex assembly, thus increasing HIF stability.

Using clones generated in a VHL disease cellular model, in which RSUME was silenced, we verified the critical role of RSUME in the loss of VHL function. Lower levels of RSUME resulted in a gain of function in VHL. This resulted in a decrease in VEGF-derived vascularization *in vivo* and smaller and less vascularized tumors.

In conclusion, studying the role of RSUME in different experimental models and through complementary experimental strategies, our results provide new evidences of the fundamental role of RSUME in the VHL syndrome and propose molecular mechanisms to explain the action of RSUME on VHL, emphasizing that RSUME is not only a promoter of sumoylation but -as seen for VHL- regulates other proteins through the formation of complexes that modify its function.

Keywords: HIF, VHL, von Hippel-Lindau syndrome, Ubiquitination, RSUME, RWDD3, Sumoylation, VEGF

Introducción

I. Importancia del Oxígeno: Respuesta adaptativa a la Hipoxia celular

El continuo suministro de O_2 a todas las células del organismo, es vital para la supervivencia de los eucariotas superiores. Debido a la importancia metabólica del oxígeno, se han desarrollado sistemas eficientes para la captación del O_2 atmosférico y su distribución a todas las células del organismo, tales como el sistema cardiovascular, respiratorio y hematopoyético (Samanta et al., 2017; Semenza, 2007).

La respiración celular está optimizada para funcionar en presiones normales de oxígeno (normoxia). Desviaciones hacia niveles mayores a los fisiológicos (hiperoxia) o por debajo del requerido para un tejido (hipoxia) (Hockel y Vaupel, 2001), generan cambios metabólicos en las células que resultan en un incremento de especies reactivas del oxígeno (ROS). Las especies ROS producen oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, generando disfunción y consecuentemente muerte celular (Prabhakar y Semenza, 2015; Samanta et al., 2017; Simon, 2006).

A lo largo de la evolución se han desarrollado mecanismos de homeostasis que regulan finamente la concentración de O_2 a la que es expuesta una célula, manteniéndola dentro del rango fisiológico (Semenza, 1999). Como parte del mecanismo de homeostasis surgieron células especializadas que tienen la capacidad de detectar y responder al cambio en los niveles de O_2 . Además se encontró que existen cascadas enzimáticas muy conservadas que responden a la disminución de O_2 (Bruick, 2003).

II. Respuesta adaptativa a la hipoxia

La hipoxia puede ser fisiológica, condición en la que la demanda de oxígeno supera al suministro por el sistema circulatorio, como durante el ejercicio muscular, en altura o en el desarrollo que se generan disminuciones en el repertorio de O_2 por el crecimiento de tejidos. También puede ocurrir en condiciones fisiopatológicas como son la disminución en el suministro de oxígeno por insuficiencia vascular, insuficiencia cardíaca, enfermedades obstructivas pulmonares crónicas o en regiones pobremente vascularizadas de tumores en desarrollo, entre otros (Lisy y Peet, 2008; Papandreou et al., 2005; Semenza, 1998). Frente a la hipoxia, se genera una respuesta que involucra cambios tanto a nivel del metabolismo celular como sistémicos, y la magnitud de dichos cambios depende del grado y de tiempo con bajas concentraciones de O_2 .

Ante la exposición aguda, se sucede un cambio metabólico rápido en las células que lleva a una disminución repentina del consumo de O_2 (Figura 1). Debido a la ausencia del último aceptor de electrones de la respiración aerobia, se genera un cambio hacia

el metabolismo anaerobio a través de la estimulación de la vía glucolítica (Papandreou et al., 2005). Ocurre un aumento en la expresión de enzimas de la glucólisis y del transportador de la glucosa (GLUT1), permitiendo que la glucosa disponible sea suficiente para la generación del ATP necesario para la subsistencia celular. La expresión en enzimas como PDK1, que inhiben la entrada al ciclo de Krebs aseguran que la célula adquiera un metabolismo anaerobio (Majmundar et al., 2010). Esto último, produce una disminución en la producción ROS, favoreciendo la supervivencia celular en hipoxia.

Una vez que el repertorio energético se torna limitante, se desarrollan mecanismos para disminuir el consumo de ATP, a través de procesos como la inhibición del ciclo celular y la apoptosis (Papandreou et al., 2005).

A nivel sistémico, se desencadenan mecanismos que permiten dar al tejido un mayor suministro de O₂ (Semenza, 2012) (Figura 1). Para ello, es necesario aumentar el flujo sanguíneo a través de la vasodilatación de vasos pre-existentes, gatillado por el agente vasodilatador óxido nítrico (NO), que en hipoxia se ve aumentado por la producción de la óxido nítrico sintasa (iNOS) (Samanta et al., 2017; Semenza, 2000). A su vez, es necesario que se generen nuevos vasos sanguíneos que lleguen a zonas pobremente vascularizadas. Esto es mediado por la expresión de numerosos factores de crecimiento y citoquinas pro-angiogénicos (Rey y Semenza, 2010; Semenza, 1999). Además, por aumento de la expresión de la eritropoyetina (EPO), hormona que media la eritropoyesis en la médula ósea (Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2007; Semenza, 1999), se genera un incremento en la dotación de glóbulos rojos en circulación.

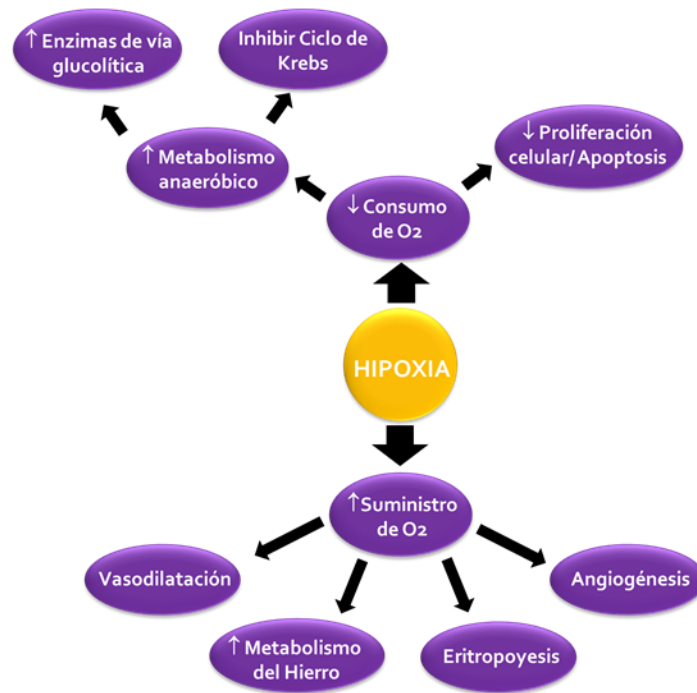


Figura 1: Respuesta celular y sistémica a la hipoxia. Se muestran los principales procesos que se dan en la respuesta adaptativa a la hipoxia. A nivel celular se desencadenan mecanismos de disminución de consumo de O_2 . Para períodos más prolongados se producen mecanismos que aumentan el suministro de O_2 a los tejidos, normalizando sus niveles.

Si bien existen numerosos mecanismos moleculares que generan una respuesta adaptativa a la hipoxia, los Factores de transcripción Inducibles por Hipoxia (HIFs) han sido descritos, desde su descubrimiento en 1992 (Semenza y Wang, 1992), como los reguladores maestros de la homeostasis del oxígeno (Samanta et al., 2017; Semenza, 2009).

III. Factores Inducibles por Hipoxia (HIF)

Los factores HIF (Figura 2) son complejos heterodiméricos compuestos por subunidades α y β . Ambas contienen en su secuencia dominios básicos de dimerización y de unión al ADN, bHLH-PAS, presentes en numerosos factores de transcripción. Las subunidades HIF- α y HIF- β (ARNT) interaccionan a través del dominio PAS, conformando el factor HIF y se unen al ADN por medio de los dominios bHLH (Wang et al., 1995).

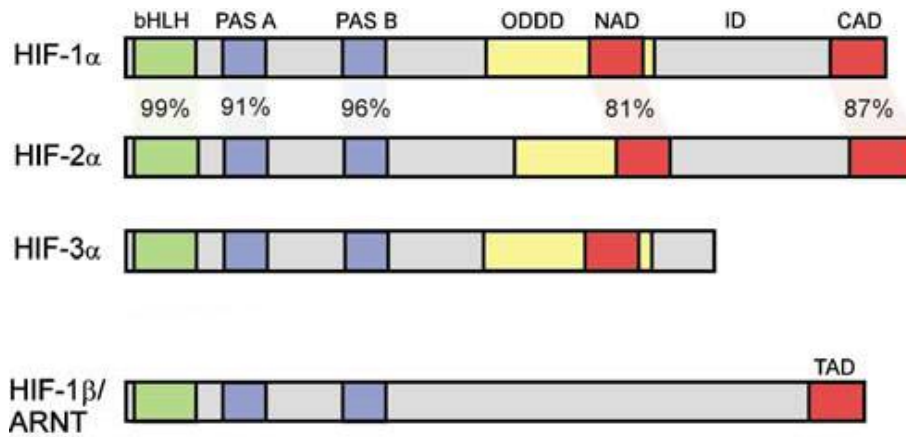


Figura 2: Isoformas de HIF y sus diferentes dominios. Se muestra un esquema indicando los tres parálogos de HIF- α reportados y la subunidad HIF-1 β o ARNT. Se muestran el Dominio de Degradación Dependiente de Oxígeno (ODDD) en amarillo, los dominios de transactivación TAD en rojo (hacia N terminal el NAD y hacia el C terminal el CAD), los dominios de unión a DNA bHLH en verde y en azul los dominios de dimerización. Se muestra el porcentaje de similitud de aminoácidos entre los dominios de los parálogos HIF-1 α y HIF-2 α .

Más de 1500 genes son transactivados por la unión específica de HIF a sitios denominados “Elementos de Respuesta a Hipoxia” (HRE) (Figura 3). Se caracterizan por tener la secuencia 5-RCGTG-3 (R corresponde a A o G) y pueden estar localizados tanto en la zona promotora del gen a ser estimulado como en regiones distales (Prabhakar y Semenza, 2015; Semenza et al., 1996; Wang et al., 1995).

Hipoxia

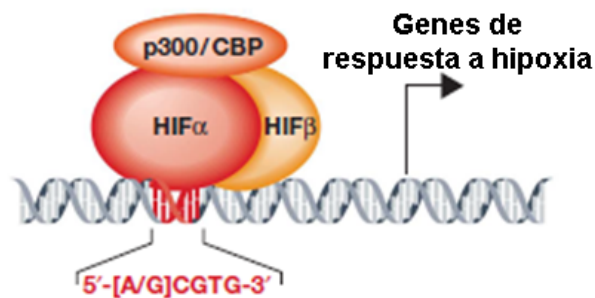


Figura 3: Esquema representativo de la unión de los factores HIF al elemento de respuesta HRE. En hipoxia las subunidades de HIF- α migran al núcleo, donde reside HIF- β . El dímero (HIF) se une al elemento de respuesta HRE, recluta co-activadores como p300/CBP y estimula la expresión de genes de la respuesta adaptativa a hipoxia.

A la fecha se ha descrito una única subunidad β de expresión constitutiva y localización nuclear (HIF-1 β) y tres subunidades α , que son estrictamente reguladas por los niveles de O₂ (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3) (Lisy y Peet, 2008; Prabhakar y Semenza, 2015; Schofield y Ratcliffe, 2005) (Figura 2). Mientras que HIF-1 y 2 α son capaces de unirse a HIF- β para formar un factor de transcripción funcional e inducir

genes de la respuesta a hipoxia (Figura 3), el rol que juega HIF-3 α es aún objeto de estudio (Duan, 2016; Samanta et al., 2017).

Una vez que los factores HIF se unen a los sitios HRE, deben reclutarse co-activadores transcripcionales para formar un complejo de iniciación de la transcripción. HIF-1 y 2 α contienen dos sitios de transactivación. En la región C-terminal se encuentra el dominio CAD, que es regulable por O₂ y un dominio ubicado hacia la zona central de la proteína denominado dominio de transactivación N-terminal (N-TAD) (Jiang et al., 1997; Lisy y Peet, 2008; Pugh et al., 1997) (Figura 2). Ambos dominios reclutan a los co-activadores de la transcripción como a CBP/p300, así como a otros que promueven una robusta activación transcripcional (Arany et al., 1996; Carrero et al., 2000; Ema et al., 1999; Kallio et al., 1998; Pugh et al., 1997; Ruas et al., 2010) (Figura 3).

Numerosos estudios muestran que ambas isoformas de HIF- α regulan la expresión de genes inducibles por hipoxia. Sin embargo, hay genes que son regulados específicamente por HIF-1 α o HIF-2 α (Hu et al., 2003; Keith et al., 2011; Raval et al., 2005). A fines de determinar las razones de dicha especificidad, se intercambiaron los dominios de transactivación de las variantes de HIF- α y se determinó que la especificidad de la activación de genes está dada por interacción diferencial de los dominios NAD de HIF-1 y 2 α con co-factores de la transcripción (Jiang et al., 1997; Lau et al., 2007). Si bien HIF-1 α está expresado en casi todas las células, HIF-2 α se encuentra restringida a algunos tipos celulares (Keith et al., 2011), siendo muy abundante en las células vasculares, indicando un fuerte rol de HIF-2 α en la vasculogénesis y angiogénesis (Keith et al., 2011; Tian et al., 1997).

III.1 **Regulación de las isoformas de HIF- α**

Las subunidades de HIF no se encuentran igualmente reguladas. Mientras que HIF-1 β es de expresión constitutiva y de localización nuclear, la estabilidad de las subunidades HIF- α es principalmente regulada por modificaciones post-traduccionales que dependen de niveles de O₂. De este modo, las subunidades α son las que limitan la actividad transcripcional de HIF (Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2007, 2009; Semenza, 1998, 1999). Si bien HIF-1 y HIF-2 α presentan un 48% de identidad, comparten los mecanismos moleculares que regulan su estabilidad y actividad transcripcional (Keith et al., 2011).

Tanto HIF-1 α como HIF-2 α son continuamente transcritas y traducidas, sin embargo, en normoxia, estas proteínas son blanco de una muy rápida degradación (vida media

de 5 minutos aproximadamente) a través del sistema Ubiquitina-Proteasoma (Figura 4) (Lisy y Peet, 2008; Yu et al., 1998). Para que ocurra la ubiquitinación de las subunidades HIF- α , es necesaria la previa hidroxilación específica de dos prolinas presentes en una región sumamente conservada en las subunidades α (Pro 402 y 564 para HIF-1 α y Pro 405 y 531 para HIF- α) (Keith et al., 2011; Loboda et al., 2010). Esta modificación es necesaria y suficiente para que ocurra la degradación de HIF. Por ello, a esta región se la denominó Dominio de Degradación Dependiente de Oxígeno (ODD) (Huang et al., 1998) (Figura 2).

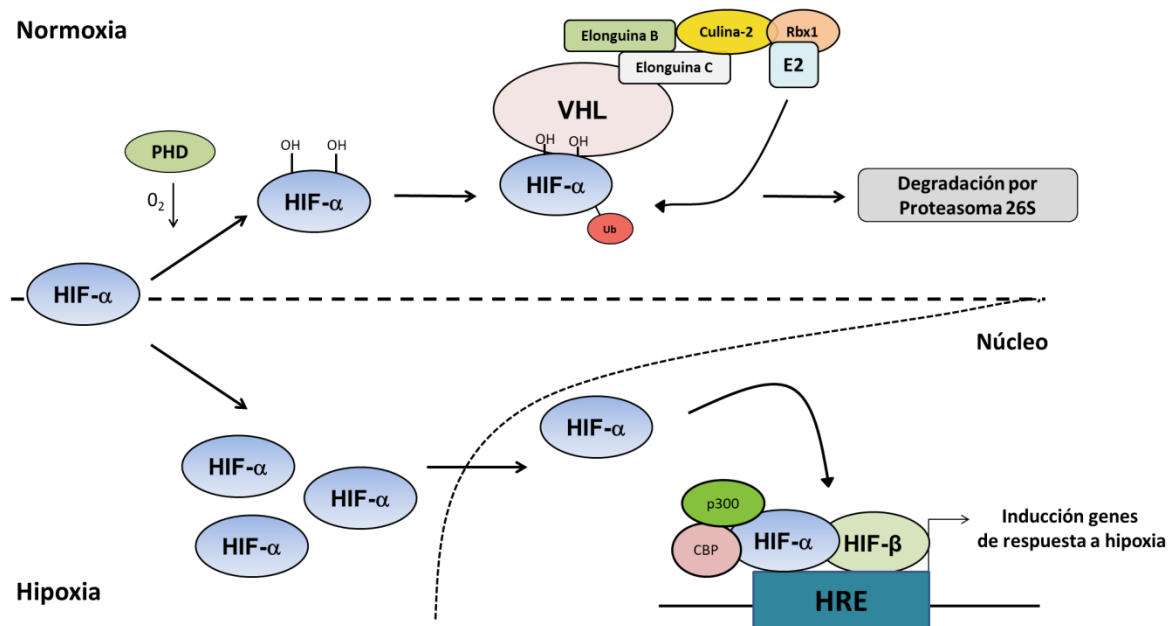


Figura 4: Regulación de HIF- α por oxígeno: HIF está compuesto por la subunidad HIF-1 β o ARNT, de localización nuclear y expresión constitutiva y HIF- α regulada por los niveles de O₂. En normoxia es reconocido por las 4-Prolilhidroxilasas (PHD) que hidroxilan a HIF- α en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD). Esto permite el reconocimiento de HIF- α por el complejo proteico ECV, conformado por VHL, Elonguina C, Elonguina B, Culina 2 y Rbx-1, entre otros. Este complejo de actividad E3 ligasa de Ubiquitina etiqueta a HIF- α para ser degradado en el proteasoma. En hipoxia, los sensores de O₂ no son funcionales, HIF- α escapa a la degradación se dirige al núcleo donde conforma el factor de transcripción HIF, este se une a los elementos de respuesta HRE e induce la expresión de genes asociados a la respuesta adaptativa a la hipoxia.

III.2 Modificaciones post-traduccionales que regulan la actividad y estabilidad de HIF

Tal como se mencionó previamente, la disponibilidad de HIF- α es el factor clave en la regulación de la actividad de transcripcional de HIF. A lo largo de esta sección se describirán una serie de modificaciones postraduccionales que se dan sobre las subunidades de HIF α (Figura 5). Estas modifican tanto su estabilidad como la capacidad de las subunidades HIF- α de reclutar co-activadores de la transcripción.

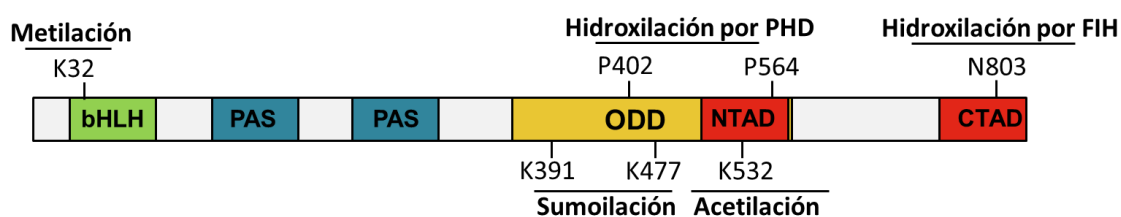
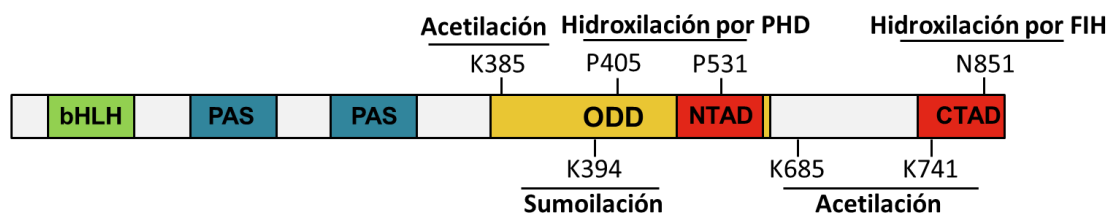
HIF-1 α **HIF-2 α** 

Figura 5: Modificaciones postraduccionales de las cuales HIF-1 y HIF-2 α son blanco. Se indica en un esquema representativo las principales modificaciones que han sido reportadas para cada una de las isoformas de HIF- α .

III.2.1 Hidroxilación de HIF en prolinas: regulación de estabilidad

La importancia del dominio ODD en las subunidades de HIF- α radica en que en su secuencia contienen sitios consenso para que ocurra la hidroxilación de dos prolinas (Pro 402 y 564 para HIF-1 α y Pro 405 y 531 para HIF2- α) (Loboda et al., 2010). Esta modificación resulta clave para que sea posible la degradación de las subunidades de HIF- α por el proteasoma (Kaelin y Maher, 1998; Schofield y Ratcliffe, 2005), tal como se desarrollará más adelante.

Las enzimas que catalizan dicha reacción son las denominadas Prolilhidroxilasas. Estas proteínas son dioxigenasas dependientes del 2-oxoglutarato y requieren para su actividad tanto del Fe²⁺ como del O₂ (co-sustrato de reacción) (Kivirikko y Myllyharju, 1998; Marxsen et al., 2004; Tandon et al., 1998). Dado que presentan una gran sensibilidad y dependencia de los niveles de oxígeno, son reconocidas como los verdaderos sensores del oxígeno celular (Schofield y Ratcliffe, 2005), teniendo un rol esencial en la regulación de la actividad de los factores HIF. De hecho, mutaciones de HIF- α en los sitios de hidroxilación, así como inactivación de las prolilhidroxilasas por manipulación genética o farmacológica, llevan a un aumento desmedido de la estabilidad de HIF y una activación constitutiva la vía de señalización de los factores HIF, que resulta independiente de los niveles de oxígeno (Lisy y Peet, 2008; Schofield y Ratcliffe, 2005).

En humanos existen al menos tres isoformas de estas oxigenasas con capacidad de reconocer a HIF- α e hidroxilarlo, PHD1, PHD2 y PHD3 (del inglés Prolyl Hidroxylase

containing-domain protein), que reconocen el dominio estructural consenso dado por la secuencia LXXLAP (Lisina, X aminoácido, Alanina, Prolina), del dominio ODD de HIF-1 α y HIF-2 α . Si bien hay reportadas tres isoformas, el silenciamiento de PHD2 es suficiente para lograr la estabilización de HIF- α en normoxia y la activación sus genes blanco (Berra et al., 2003). Paradójicamente, las PHD son estimuladas en hipoxia a través de HIF-1, lo que da cuenta de una retroalimentación negativa que regula la actividad de este factor de transcripción (Berra et al., 2001; Huang et al., 2002).

III.2.2 Hidroxilación de HIF en asparagina: regulación de la actividad transcripcional

La hidroxilación de HIF- α también ocurre fuera del dominio ODD. En este caso ocurre en el dominio CAD de las subunidades HIF- α , en particular en la asparagina 803 de HIF-1 α y en la 851 en HIF-2 α . La enzima encargada de catalizar dicha modificación, FIH (del inglés Factor Inhibiting HIF-1), es una asparagil beta-hidroxilasa que también es una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato, O₂ y Fe²⁺ (Lancaster et al., 2004; Lisy y Peet, 2008).

Se ha encontrado que la hidroxilación en esta única asparagina es suficiente para impedir la interacción de CAD con los coactivados CBP/p300, silenciando por completo la actividad transcripcional de HIF en normoxia (Hewitson et al., 2003; Lando et al., 2002).

La hipoxia inhibe la hidroxilación de CAD por FIH-1, facilitando el reclutamiento de coactivadores al CAD. A diferencia de las PHDs, FIH-1 es menos sensible a la disminución de oxígeno. Por ello, la modificación en la asparagina funciona como interruptor molecular extra, ya que a pesar de que haya estabilización de las subunidades HIF- α , en determinadas concentraciones de O₂, la transcripción dependiente de HIF se mantiene inactiva, requiriendo aún menor tensión de oxígeno para su activación (Bracken et al., 2003; Lisy y Peet, 2008).

III.2.3 Ubiquitinación: regulación de estabilidad

Tal como se mencionó previamente, la hidroxilación de las prolina en los dominios ODD de HIF-1 y HIF-2 α es el paso inicial para su degradación en normoxia. Esto permite que las subunidades de HIF- α sean reconocidas específicamente y etiquetadas con cadenas de Ubiquitina (Ub), señal necesaria y suficiente para que ocurra la degradación de las proteínas por el proteasoma (Ohh et al., 2000; Tarade y Ohh, 2018) (Figura 6).

La ubiquitinación cumple un rol clave en diversos procesos celulares como son el control del ciclo celular, apoptosis, transducción de señales, transcripción de genes, respuesta a estrés y autofagia, entre otros (Ciechanover y Schwartz, 2004; Hochstrasser, 2009; Swatek y Komander, 2016). Sin embargo, la función más estudiada sobre la ubiquitinación es la degradación de proteínas a través del proteasoma 26S (Livneh et al., 2016).

La ubiquitinación es una cascada de reacciones que involucra a tres tipos de enzimas, la activadora de ubiquitina (E1), las de conjugación de ubiquitina (E2) y las ligasas de ubiquitina (E3). Primero, la E1 activa la ubiquitina de manera dependiente de ATP, luego la ubiquitina activada es transferida a la E2 que interactúa con las E3 ligasas, quienes reconocen a su sustrato específico, permitiendo que la Ub se una covalentemente en una lisina de la proteína blanco (Hershko y Ciechanover, 1998) (Figura 6). La ubiquitina es una proteína pequeña compuesta por 76 aminoácidos y contiene siete residuos de lisina en los que se pueden conjugar otras moléculas de Ubiquitina. Las proteínas pueden sufrir diferentes patrones de ubiquitinación como la mono ubiquitinación: una única ubiquitina está unida a la proteína; multi-ubiquitinación: múltiples ubiquitinas individuales están vinculadas a la proteína o poli-ubiquitinación: una cadena de poli-ubiquitina está vinculada a la proteína (Ciechanover y Schwartz, 2004; Swatek y Komander, 2016). El tipo de ubiquitinación determina el destino la proteína blanco. La mono ubiquitinación está involucrada en diferentes procesos celulares tales como endocitosis, reparación del ADN, regulación de histonas y transporte de proteínas; la multiubiquitinación está implicada en la endocitosis y la poli-ubiquitinación tiene un papel bien conocido en la degradación proteica dirigida por el proteasoma 26S (Haglund et al., 2003; Hershko y Ciechanover, 1998; Lub et al., 2016).

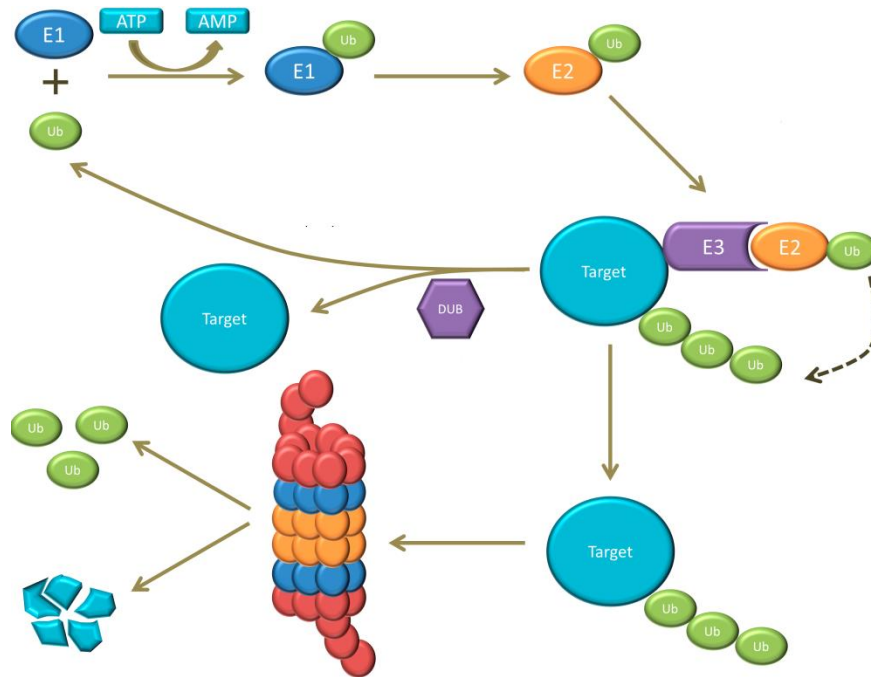


Figura 6: Esquema representativo del sistema Ubiquitina Proteasoma. Mecanismo de ubiquitinación de proteínas en su camino a la degradación por el proteasoma 26S. La proteína E1 activadora dependiente de ATP, E2 conjugasa de Ubiquitina y E3 ligasa de Ubiquitina de la proteína blanco o target, que controla la especificidad de sustrato de la reacción. La proteína ubiquitinada puede ser reconocida por el Proteasoma 26S que la degrada activamente. También, enzimas Deubiquitininas (DUB) pueden revertir la ubiquitinación de una proteína target. Esquema adaptado de (Lub et al., 2016).

En particular, para las subunidades de HIF-1 y 2α , la ubiquitinación ocurre gracias al reconocimiento específico, de los HIF- α hidroxilados, por el supresor tumoral von Hippel-Lindau (VHL), que conformando un complejo con otras proteínas, tiene función de E3 ligasa de Ubiquitina, tal como se desarrollará más adelante.

III.2.3.1 E3 ligasa de Ubiquitina de HIF- α

Como se explicó anteriormente, la ubiquitinación de HIF es la principal vía de regulación de su estabilidad en normoxia. La determinación de cuál es la E3 ligasa de ubiquitina específica de HIF- α se dio a través del estudio del síndrome hereditario von Hippel-Lindau o VHL. En esta enfermedad, la pérdida de función de la proteína VHL lleva a tumores altamente vascularizados que sobre-expresan en forma desmedida proteínas características de la respuesta a hipoxia (Gossage et al., 2015; Gossage et al., 2014; Kaelin y Maher, 1998; Maher et al., 2011). Cuando se utilizaron células que no expresaban VHL, se vio que había elevados niveles de genes que son blanco transcripcionales de HIF como VEGF y GLUT-1, tanto en normoxia como hipoxia. La expresión ectópica de VHL resultó una disminución de la expresión de dichos genes en normoxia, restaurando su fenotipo salvaje (Gnarra et al., 1996; Iliopoulos et al.,

1996; Kaelin y Maher, 1998), indicando que VHL media la inhibición de los factores HIF. Esto fue corroborado posteriormente (Maxwell et al., 1999) en estudios que demostraron que en normoxia, VHL se une a HIF-1 α y es responsable de la degradación de HIF-1 α oxígeno-dependiente. Sumado a esto, ensayos *in vivo* en células deficientes para VHL o con células que expresaban VHL mostraron que aquellos ratones inyectados con células expresando VHL presentaron menor formación de tumores (Bae et al., 2004; Iliopoulos et al., 1995; Iliopoulos et al., 1996), demostrando el rol de VHL como un supresor tumoral.

A partir de estos descubrimientos, se llevaron a cabo estudios bioquímicos para determinar el mecanismo por el cual VHL ejerce su función sobre HIF. VHL forma un complejo con las proteínas Elonguina C, Elonguina B y Culina-2 (complejo ECV) (Kaelin y Maher, 1998; Kibel et al., 1995; Nguyen et al., 2015; Ohh et al., 1998). Estudios sobre el complejo ternario ECV indicaron que las proteínas con las que VHL interactúa presentan homología con proteínas de un complejo proteico de levaduras con función de E3 ligasa de ubiquitina, el complejo SCF. La Elonguina C es homóloga a Skp1, Elonguina B a la ubiquitina y la Culina-2 a la Culina SFC (Stebbins et al., 1999). Se determinó que VHL funciona como la proteína encargada del reconocimiento específico de HIF1- α y HIF-2 α en la cascada de ubiquitinación (Gossage et al., 2015; Kaelin, 2008, 2017; Kaelin y Maher, 1998) (Figura 7).

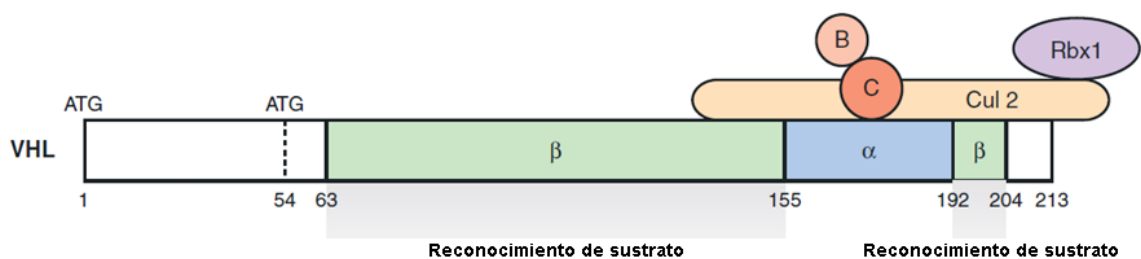


Figura 7: Esquema representativo de complejo ECV. Se muestra un esquema indicando los dominios de la proteína VHL. A través del dominio α , VHL se une a Elonguina C, Elonguina B, Culina-2 y Rbx1, conformando el complejo ECV. El dominio β de VHL es la región por la cual se da el reconocimiento específico de sustrato.

La formación del complejo ECV es crítica para la función de VHL sobre la regulación de HIF. De hecho, mutantes de VHL, incapaces de unirse a Elonguina C, presentaron incrementada expresión de genes regulados por HIF (Lonergan et al., 1998). En línea con esto, se ha visto que gran parte de las mutaciones sobre VHL que inactivan su función y que presentan fenotipo tumoral desestabilizan la unión con Elonguina C

(Kaelin, 2017; Nordstrom-O'Brien et al., 2010; Stebbins et al., 1999; Varshney et al., 2017).

Se introducirán detalles sobre el supresor tumoral VHL en secciones subsiguientes de esta introducción.

III.2.4 SUMOilación; regulación de estabilidad y actividad

En los eucariotas existen alrededor de veinte proteínas que pertenecen a la familia de Ubiquitina. Las proteínas similares a Ubiquitina o UBLs (del inglés Ubiquitin-like proteins) se asemejan en secuencia y/o estructura tridimensional a la Ubiquitina (Hay, 2005; Schulman, 2011; van der Veen y Ploegh, 2012).

Dentro de las UBLs se encuentra a los péptido SUMO (Small Ubiquitin-Like Modifiers), que si bien presentan baja identidad de secuencia con la ubiquitna (20%), tienen alta homología estructural (Hay, 2005). A la fecha, en vertebrados, se han identificado cinco variantes de SUMO (SUMO1-5), siendo SUMO1, SUMO2 y SUMO3 las más estudiadas (Han et al., 2018).

Así como la Ubiquitina, los péptidos SUMO se unen covalentemente a lisinas en las proteínas blanco, utilizando una cascada enzimática semejante a la de ubiquitinación. La reacción ocurre en tres pasos, SUMO es activado en forma dependiente de ATP por la E1 (SAE1/SAE2 en humano), para formar el intermediario E1-SUMO. Luego es transferido a la E2 conjugasa de SUMO, Ubc9 y finalmente el mismo Ubc9 transfiere SUMO al sustrato. A diferencia de la ubiquitinación, en la que se requiere la acción de una E3 ligasa que reconoce específicamente al sustrato, en la sumoilación Ubc9 lo reconoce directamente y cataliza la conjugación de SUMO (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007; Hay, 2005; Wilkinson y Henley, 2010). Existen numerosas E3 ligasas de SUMO, que actúan como una plataforma o *scaffold* que acerca la Ubc9-SUMO al sustrato facilitando la conjugación (Figura 8) (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007; Hay, 2005; Wilkinson y Henley, 2010).

La mayoría de los sitios de sumoilación son reconocidos por poseer el motivo Ψ -K-X-E o Ψ -K-X-D (donde Ψ es un aminoácido grande hidrofóbico, X puede ser cualquier aminoácido, K es la lisina aceptora, E es el glutamato y D es asparagina) (Duprez et al., 1999; Rodriguez et al., 2001), aunque existen varios sitios de sumoilación que no se ajustan a los sitios consenso (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007; Han et al., 2018; Wilkinson y Henley, 2010).

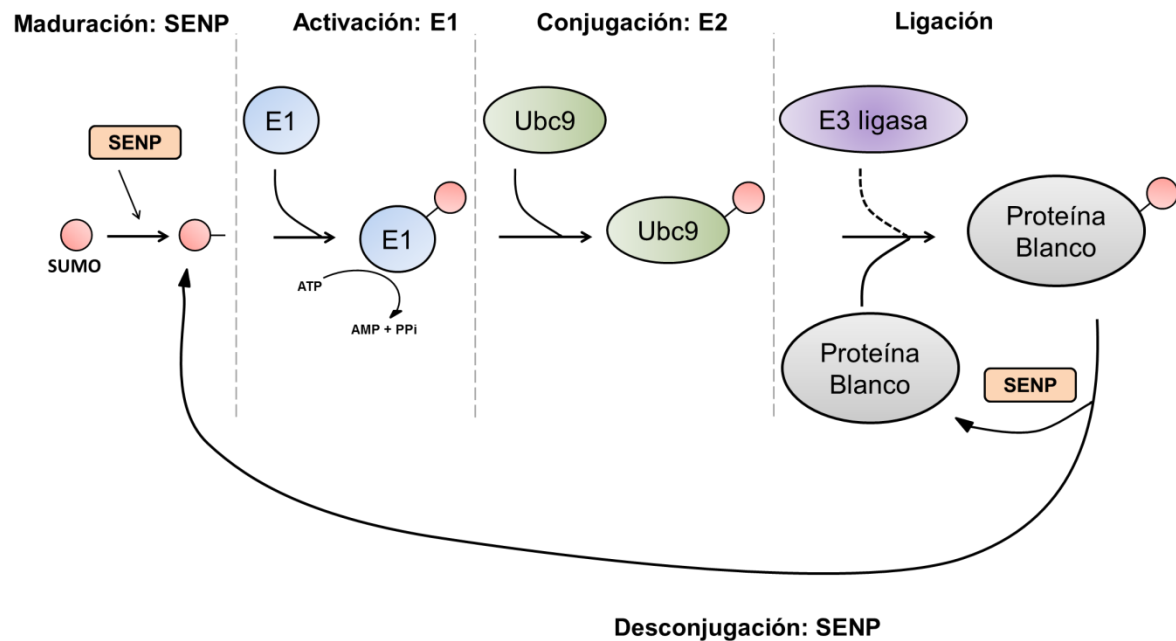


Figura 8: Cascada de Sumoilación de proteínas. SUMO es sintetizado primero como una pre-proteína que madura por una proteólisis mediada por una SUMO isopeptidasa (SENP) que expone el residuo de glicina C-terminal. La activación es por la enzima E1 (Aos1/Uba2 en *S. cerevisiae*, SAE1/SAE2 en humanos). Luego el SUMO pasa a Ubc9, de donde es conjugada en un residuo lisina de la proteína blanco. Las SUMO ligasas E3 funcionan como adaptadores entre Ubc9 y el sustrato para aumentar la eficiencia y especificidad de la reacción. Las isopeptidasas pueden desconjugar SUMO de la proteína blanco liberando SUMO.

Debido a la acción de las enzimas isopeptidasas de SUMO (SENP1-3 y SENP5-7) la sumoilación es una modificación reversible, ya que estas cortan el enlace isopeptídico entre SUMO y sus sustratos. Además, cumplen un rol esencial en la cascada de sumoilación, ya que procesa a los péptidos SUMO recién sintetizados para activarlo en el proceso de maduración, dejando SUMO disponible para ser conjugado (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007; Hay, 2005).

Respecto a la sumoilación de los factores HIFs, existe un reporte que describe que HIF-2 α es sumoilada en hipoxia en la lisina 394 (van Hagen et al., 2010). Esta modificación lleva a la degradación de HIF-2 α por E3 ligasas de ubiquitinas dependientes de SUMO, como la proteína RNF4 (van Hagen et al., 2010).

Por su parte, HIF-1 α es blanco de sumoilación en las Lisinas 391 y 477 en hipoxia y su impacto en la estabilidad y actividad transcripcional ha sido ampliamente discutido (Bae et al., 2004; Carbia-Nagashima et al., 2007; Chan et al., 2011; Cheng et al., 2007; Jiang et al., 2015; Li et al., 2014; Li et al., 2007; Nunez-O'Mara y Berra, 2013; Shao et al., 2004; Ulrich, 2007). En los últimos años, y en línea con trabajos previos de nuestro laboratorio y otros (Bae et al., 2004; Carbia-Nagashima et al., 2007), numerosos grupos han reportado a la sumoilación como un modulador positivo de la estabilidad y actividad de HIF-1 α (Chan et al., 2011; Han et al., 2015; Jiang et al., 2015; Li et al.,

2014; Mei et al., 2014), aunque hay algunos trabajos que describen que la sumoilación de HIF-1 α produce una disminución en su estabilidad (Cheng et al., 2007; Kang et al., 2010) o en su actividad transcripcional (Berta et al., 2007; Kang et al., 2010).

III.2.5 Otras Modificaciones postraduccionales sobre HIF

Se han reportado además otras modificaciones sobre HIF que no serán desarrolladas a lo largo de la presente Tesis (Figura 5):

La acetilación de la Lisina 532 ubicada en el dominio ODD de HIF-1 α por la acetiltransferasa ARD-1 (Jeong et al., 2002) ocurre independientemente de los niveles de O₂. Dicha modificación favorece la interacción de HIF-1 α con VHL aumentando la degradación vía proteasoma 26S (Jeong et al., 2002). Para HIF-2 α , se ha descrito que ocurre acetilación en las lisinas K385, K685 y K741 (Dioum et al., 2009). Esta modificación puede ser revertida por la proteína de la familia de las sirtuinas SIRT-1 en hipoxia, incrementando la actividad de HIF-1 y HIF-2 (Chen et al., 2011; Keith et al., 2011).

La fosforilación de HIF ha sido ampliamente estudiada, encontrándose numerosos sitios en las subunidades de HIF- α que impactan en la estabilidad, actividad y localización nuclear (Keith et al., 2011; Kietzmann et al., 2016).

Finalmente, recientemente se ha descrito que en normoxia, HIF-1 α es blanco de metilación en la lisina 32, por la metiltransferasa SET7/9. Independientemente de la regulación de la estabilidad de HIF- α en el citoplasma por VHL, la metilación ocurre en el núcleo promoviendo la degradación de HIF mediante el sistema Ubiquitina Proteasoma (Baek y Kim, 2016).

IV. Supresor Tumoral von Hippel-Lindau

El gen de VHL codifica para una proteína de 213 aminoácidos (24-30Kda) (pVHL). En la proteína se distinguen dos dominios, el dominio α (tres α hélices) en la región C-terminal, comprendido entre los aminoácidos 155 a 192, y un dominio β hacia el N-terminal, comprendido entre los aminoácidos 64 a 154, (siete hojas β) (Gossage et al., 2015; Kaelin, 2017; Stebbins et al., 1999). Ambos dominios tienen funciones diferenciales asociadas respecto a la regulación de HIF- α (Figura 7).

El dominio α está codificado por el exón 3 de VHL, y es el responsable de la unión de VHL a Elonguina C. La región comprendida entre los aminoácidos 89 a 157 está en íntimo contacto con la Elonguina C, estabilizando dicha interacción. El dominio β está codificado por los exones 1 y 2. Este, es responsable del reconocimiento y unión de

sustratos, como HIF- α hidroxilado (Figura 4 y Figura 7) (Gossage et al., 2015; Gossage et al., 2014; Stebbins et al., 1999). Mutaciones en este dominio disminuyen la afinidad de VHL por HIF-1 α , sin afectar la formación del complejo ECV (Hansen et al., 2002). En el dominio β también radican puntos calientes de mutación desencadenantes de tumores asociados a la desregulación de HIF (Calzada, 2010; Nordstrom-O'Brien et al., 2010; Razafinjatovo et al., 2016; Stebbins et al., 1999).

VHL presenta funciones que son independientes de la regulación de HIF- α . Se han descrito numerosas proteínas cuya ubiquitinación está mediada por VHL: el receptor EGFR, las subunidades de la ARN polimerasa RPB1 y hsRPB7, la proteína quinasa C atípica (PKC), la proteína Sprouty2, el receptor β -adrenérgico II, la proteína AUKRA, el receptor de Estrógenos alfa (ER- α) y el co-regulador de la transcripción la proteína MYBBP1A o p-160 (Jung et al., 2012; Lai et al., 2011a; Zhang y Zhang, 2018; Zhang y Yang, 2012). Además se han descrito funciones de VHL más allá de su rol como E3 ligasa de Ubiquitina, impactando en procesos como el mantenimiento de las cilias primarias, el control de la formación de la matriz extracelular, regulación de la apoptosis, regulación de la transcripción, control de la senescencia celular, entre otros (Kaelin, 2004; Li y Kim, 2011; Tarade y Ohh, 2018). Si bien se ha avanzado en la comprensión de estos procesos en los que está involucrado VHL y se han identificado rutas de señalización afectadas por la ausencia de VHL en diferentes tipos de tumores (Kaelin, 2017; Tarade y Ohh, 2018; Zhang y Zhang, 2018; Zhang y Yang, 2012). A lo largo de esta Tesis nos centraremos en la vía más estudiada de VHL, que es la regulación de la estabilidad de las subunidades de HIF por ubiquitinación, con foco en los escenarios que llevan a la pérdida de función de VHL, elevando a HIF.

V. **RSUME o RWDD3**

En el estudio de las vías moleculares que llevan al establecimiento de tumores hipofisarios, a partir de la línea celular lactosomatotrofa de rata (GH3), sobreexpresora del transductor de la vía de señalización de citoquinas gp130, en nuestro laboratorio fue clonado por la técnica de Differential Display, un gen que codificaba para una proteína de 195 aminoácidos que posteriormente se denominó RSUME (por RWD-containing SUMO Enhancer) o RWDD3 (Carbia-Nagashima et al., 2007). Estas células presentaban elevada capacidad tumorigénica y angiogénica (Castro et al., 2003), lo que posteriormente llevó a que en el estudio de las funciones de RSUME se analizaran blancos tales como HIF, ampliamente involucrado en la angiogénesis asociada a HPX (Carbia-Nagashima et al., 2007).

Desde su descubrimiento, se han identificado siete variantes de *splicing* alternativo de ARN mensajero de RSUME, en humanos. Cinco de ellas codifican para diferentes isoformas de la proteína, mientras que las dos restantes, debido a la presencia de un codón prematuro de terminación, son blanco de degradación por el mecanismo NMD (del inglés *non-sense mediated decay*) (Gerez et al., 2013). En nuestro laboratorio hemos enfocado los estudios funcionales principalmente en la variante de 195 aminoácidos (NM_001128142), que no presenta diferencias con la isoforma larga de RSUME de 267 aminoácidos (NM_015485), respecto a la sumoilación como en la estabilización de HIF (Gerez et al., 2013).

RSUME contiene en su secuencia un único dominio que abarca los primeros 128 aminoácidos, el dominio RWD (Carbia-Nagashima et al., 2007; Gerez et al., 2013). Estos dominios reciben su nombre a partir de tres grandes familias de proteínas donde se lo ha encontrado presente: proteínas con dominios RING-finger, proteínas con repeticiones WD y helicasas de tipo DEAD (DEXD) de levaduras. Si bien no se conocía su función, en base a estudios estructurales ha sido propuesto como un dominio de interacción proteína-proteína (Doerks et al., 2002).

Una vez identificada la proteína, se estudió su sub-localización celular. RSUME se encuentra tanto en citoplasma como en núcleo, a pesar de que no presenta señales de localización nuclear NLS, lo que implicaría que RSUME puede migrar al núcleo mediante la interacción con algunos de sus blancos de acción (Carbia-Nagashima et al., 2007). La expresión de RSUME es estimulada por estrés celular como el estrés térmico y la hipoxia (Carbia-Nagashima et al., 2007). En línea con esto último, y apoyando un posible rol de RSUME como mediador de la adaptación a estrés, RSUME se encuentra aumentado en zonas hipóxicas de gliomas y de tumores de hipófisis (Carbia-Nagashima et al., 2007; Chen et al., 2018; He et al., 2017; Ji et al., 2018; Shan et al., 2012).

Análisis del perfil de expresión y distribución de RSUME en tejidos sanos humanos, por Microarrays, revelaron que el ARN de RSUME se encuentra mayormente expresado en tejidos como cerebelo, hipófisis, corazón, riñón, hígado, páncreas, próstata, estómago, bazo y glándula adrenal (Carbia-Nagashima et al., 2007) (Figura 9).

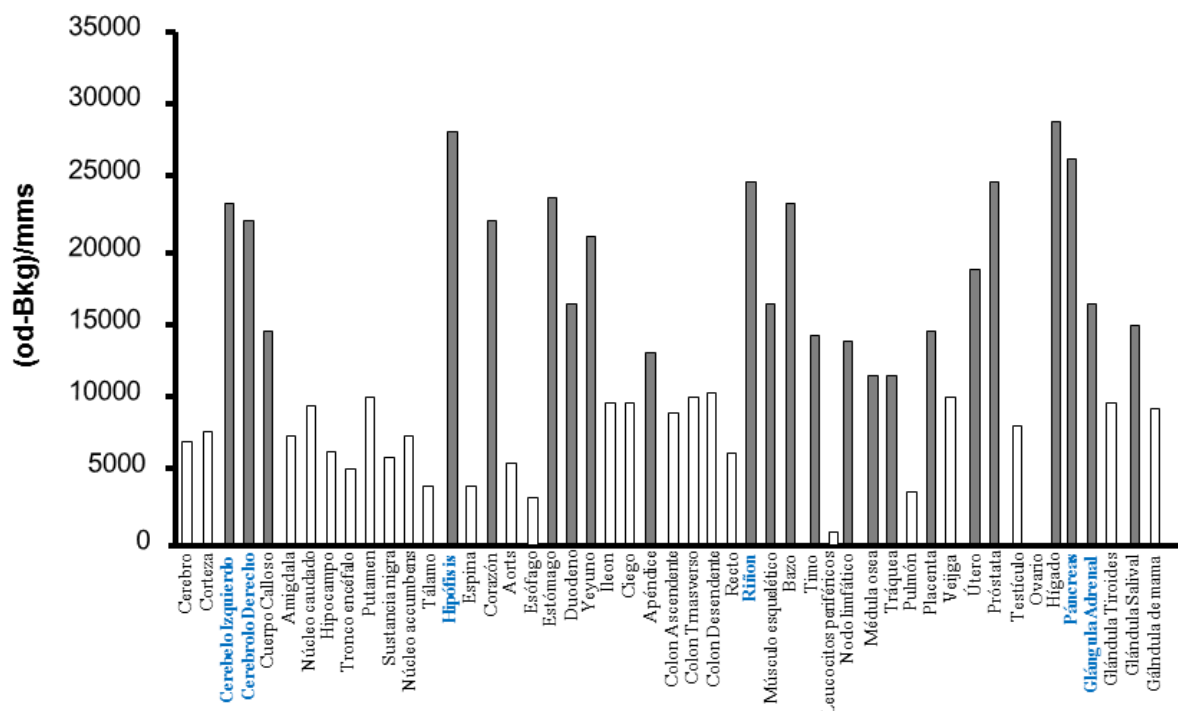


Figura 9: Distribución de RSUME en tejidos humanos sanos. Se estudió la expresión de RSUME por hibridación de una membrana de transferencia puntual de ARN mensajero comercial con la sonda de ADNc de RSUME seguida de un análisis densitométrico semicuantitativo. Los tejidos con los niveles de expresión más significativos están sombreados en gris, y aquellos de interés para el desarrollo de la patología VHL en los que RSUME se encuentra aumentado en azul.

Además, y de interés en el estudio de RSUME como un modulador de la adaptación tumoral, se encontró expresión de RSUME en tumores que se dan en estos tejidos, como son adenomas de hipófisis (He et al., 2017), gliomas (Carbia-Nagashima et al., 2007; Fuertes et al., 2018; Gerez et al., 2013; Ji et al., 2018; Shan et al., 2012), glioblastomas (Chen et al., 2018), insulinomas de páncreas (Wu et al., 2016), tumores asociados a la pérdida de VHL (Feocromocitomas en glándula adrenal, Hemangioblastomas en Sistema Nervioso Central y Carcinoma Renal de Células Claras, RCC) (Gerez et al., 2015), así como fue asociado junto a otros 15 genes como un predictor de riesgo en cáncer de mama (Huang et al., 2013; Schneider et al., 2015).

V.1 RSUME como modulador positivo de la sumoilación

El dominio RWD presenta similitud estructural con la conjugasa de SUMO E2, Ubc9, pero no tiene actividad de conjugasa (Nameki et al., 2004). RSUME cumple un rol estimulador en la cascada enzimática de sumoilación a varios niveles, facilitando la interacción de Ubc9 con la maquinaria de sumoilación, favoreciendo la unión thioéster entre Ubc9 y SUMO, paso limitante en la reacción de sumoilación y estimula favorece la transferencia de SUMO 1, 2 y 3 a los sustratos de sumoilación. Esta propiedad

como modulador positivo de la cascada de sumoilación depende de la integridad del dominio RWD de RSUME (Carbia-Nagashima et al., 2007). Se ha establecido el impacto de RSUME sobre la sumoilación de diferentes blancos asociados a la respuesta a estrés celular, como son: el receptor de Glucocorticoides (GR), regulando su actividad transcripcional (Druker et al., 2013); inhibición de la vía de NFκB por la sumoilación y consecuente estabilización del inhibidor IκB (Carbia-Nagashima et al., 2007), el aumento de la sumoilación del supresor tumoral PTEN por RSUME promueve su estabilización (Wu et al., 2016) y por último, como se discutirá más adelante, RSUME promueve la sumoilación de HIF-1α aumentando su estabilidad y actividad (Carbia-Nagashima et al., 2007).

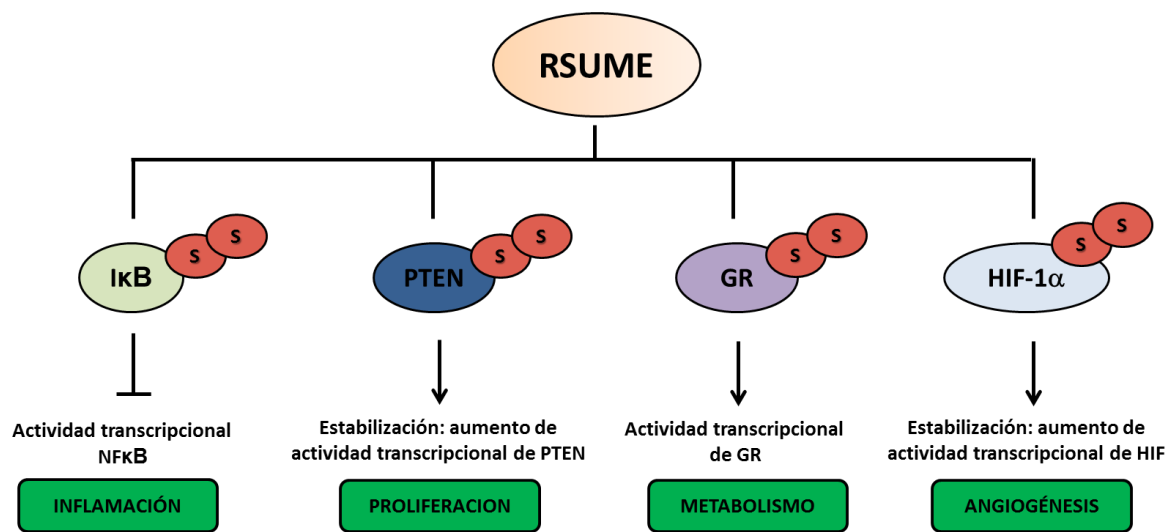


Figura 10: RSUME modula positivamente la sumoilación. Esquema representativo de las proteínas en las cuales se ha descrito que RSUME actúa como modulador positivo de la sumoilación. La sumoilación de IκB inhibe la vía de NFκB, repercutiendo en la respuesta inflamatoria. RSUME incrementa la estabilidad del supresor tumoral PTEN, que regula la proliferación celular. Ante un aumento en su sumoilación, el receptor GR incrementa su actividad transcripcional, estimulando genes de la respuesta a estrés celular. En hipoxia, RSUME promueve la sumoilación de HIF-1α, aumentando su estabilidad y actividad, actuando positivamente en procesos como la angiogénesis.

Considerando el impacto de RSUME sobre la sumoilación, que en hipoxia aumenta la sumoilación de HIF-1α (Shao et al., 2004; Ulrich, 2007), la inducción de RSUME en hipoxia y la presencia de RSUME tumores altamente vascularizados, se estudió la relación funcional entre RSUME y HIF-1α.

V.2 RSUME en la respuesta adaptativa a hipoxia por HIF

En primera instancia, cuando se estudiaron los mecanismos de inducción de RSUME en hipoxia, se determinó por un ensayo de gen portero (RSUME-LUC), que en hipoxia

HIF estimula su expresión (Carbia-Nagashima et al., 2007). Además, la expresión ectópica de VHL inhibe la expresión del RSUME-LUC (Gerez et al., 2015).

En hipoxia, RSUME aumenta la sumoilación de HIF-1 α , aumentando su estabilidad y actividad transcripcional (Carbia-Nagashima et al., 2007). Concomitantemente, se observó un aumento en los niveles de expresión de VEGF por acción de RSUME en hipoxia (Carbia-Nagashima et al., 2007; He et al., 2017; Shan et al., 2012). En normoxia, RSUME aumenta la estabilidad y actividad de HIF-1 incluso frente a la sobre-expresión de VHL, mostrando un efecto inhibitorio de RSUME sobre su función (Gerez et al., 2015). Estos resultados muestran la importancia de RSUME en la fisiología de HIF y con ello, la importancia del estudio de RSUME en condiciones en las que los mecanismos moleculares que regulan a HIF se encuentran desregulados.

VI. HIF como regulador maestro en la progresión tumoral

Durante el establecimiento de un tumor, debido a la acelerada y desorganizada proliferación de las células, se generan zonas en las cuales hay baja o nula disponibilidad de O₂, limitando el crecimiento tumoral. Se ha propuesto que puede dividirse a un tumor en tres zonas (Figura 11): la Zona I, consiste en células que se encuentran próximas a vasos sanguíneos; la Zona III está dada por aquellas células que han muerto por necrosis causada por la falta de O₂. Finalmente, la Zona II está conformada por células que desencadenan los mecanismos de adaptación de la respuesta adaptativa a hipoxia mediados por HIF-1 y HIF-2 y que son capaces de proliferar y generar el crecimiento tumoral (Samanta et al., 2017; Schito y Semenza, 2016). De hecho, encontrar células asociadas a la Zona II se considera un marcador de mal pronóstico en los pacientes, ya que debido a los procesos de reprogramación metabólicos orquestados por los factores HIF, las células resisten a las terapias anti-tumorales (quimioterapia y radioterapia) (Schito y Semenza, 2016).

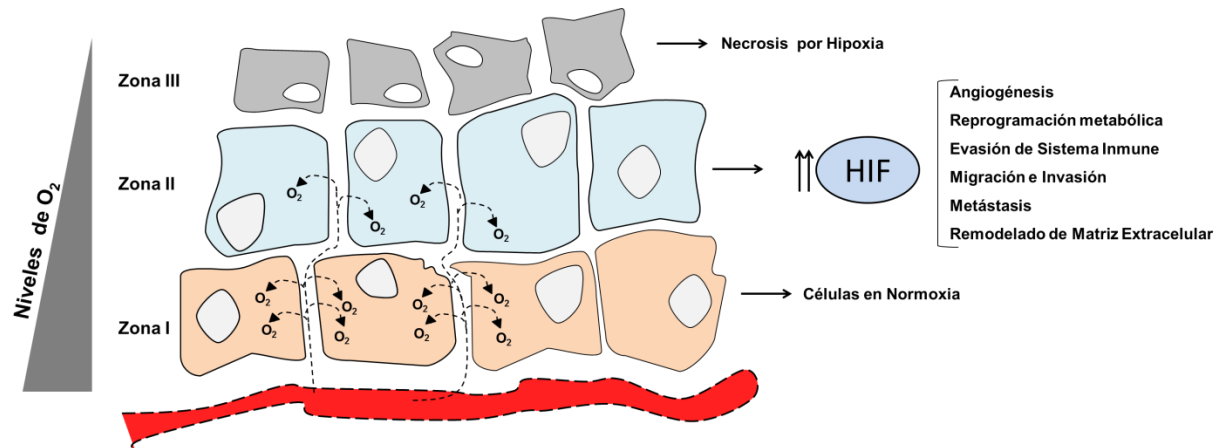


Figura 11: Zonas de tumores según disponibilidad de oxígeno. En un tumor, las células circundantes a los vasos sanguíneos tienen suficiente O_2 para su funcionamiento (Zona I). En la Zona II, frente a la disminución de los niveles de O_2 las células desencadenan mecanismos de adaptación a hipoxia vía HIF. En la Zona III, debido a la severa falta de O_2 , las células mueren por necrosis. Figura adaptada (Schito y Semenza, 2016).

Si bien la hipoxia es el principal factor para la estabilización de HIF, esta puede darse a partir de citoquinas en el ambiente tumoral, infecciones virales y mutaciones que impactan en la función de los supresores tumorales de HIF (Semenza, 2010). Como se explicará en secciones posteriores, nos centraremos en la pérdida de función de del supresor VHL, que ocurre en el síndrome von Hippel-Lindau.

La activación constitutiva de HIF, en condiciones patológicas, lleva a una inducción de los genes de la respuesta adaptativa a hipoxia que fueron mencionadas previamente. En este sentido a HIF se lo considera un factor maestro en procesos esenciales para el establecimiento y progresión tumoral, como son: la angiogénesis, el remodelado de la matriz extracelular, invasión, evasión del sistema inmune y metástasis, entre otros (Kumar y Gabrilovich, 2014; Schito y Semenza, 2016). Estudios recientes con muestras de pacientes muestran que HIF se encuentra elevado en una gran variedad de tumores y que sus niveles de expresión correlacionan clínicamente con una peor supervivencia de los pacientes (Xiu et al., 2017).

De interés particular para el desarrollo de esta Tesis, es que nos centraremos en el rol de HIF-1 y HIF-2 en el proceso de angiogénesis.

VI.1 Angiogénesis

Como fue mencionado, a medida que crecen, los tumores sólidos presentan zonas en las que el suministro de O_2 se vuelve limitante debido a la falta de vasos sanguíneos. Superado un determinado tamaño tumoral, es necesario la activación de programas de vasculogénesis (generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de progenitores) y angiogénesis (la formación de nuevos vasos a partir de la ramificación y crecimiento

de vasos pre-existentes). Cuando los factores pro-angiogénicos superan los efectos de los anti-angiogénicos, se dice que una célula tumoral ha hecho un “switch angiogénico” (Figura 12) (Baeriswyl y Christofori, 2009; Folkman y Hanahan, 1991; Hanahan y Folkman, 1996). Este desbalance desproporcionado de factores lleva a que la angiogénesis tumoral se caracterice por la presencia de vasos que son estructural y funcionalmente anormales (Carmeliet y Jain, 2011).

Si bien HIF es responsable de la inducción transcripcional de numerosos factores que promueven la angiogénesis (VEGF, receptores de VEGF, PDGF-B, inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), el receptor de TIE-2, metaloproteasas MMP2 y MMP9 y angiopoyetinas ANG-1 y ANG-2, entre otros) (Hickey y Simon, 2006; Samanta et al., 2017), VEGF ha sido el mitógeno más estudiado en relación a HIF y además, ha sido reportado como un factor altamente expresado en numerosos tumores humanos (Carmeliet, 2005; Carmeliet y Jain, 2011; Nowak-Sliwinska et al., 2018) (Figura 12).

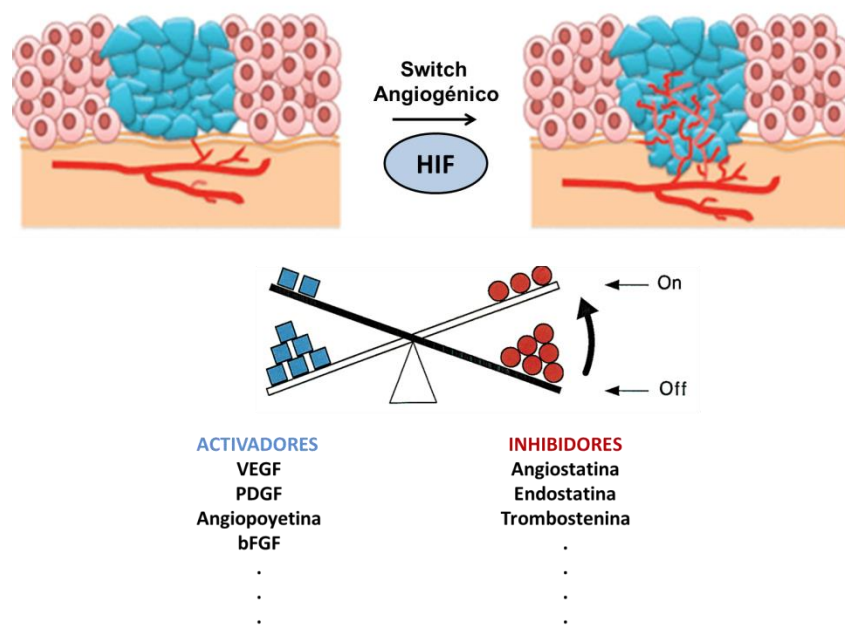


Figura 12: Switch angiogénico. Cuando el balance entre factores pro-angiogénicos supera al de los factores inhibitorios, las células quiescentes de la vasculatura se activan desencadenan el proceso de angiogénesis. La acción de los factores HIF lleva a la inducción de factores pro-angiogénicos como (VEGF). Figura adaptada (Hanahan y Folkman, 1996).

VII. Desregulación de los niveles de HIF, Síndrome von Hippel-Lindau

La enfermedad de von Hippel-Lindau es un síndrome hereditario que se caracteriza por la formación de tumores como: Hemangioblastomas del Sistema Nervioso Central y retina, quistes renales, RCC, Feocromocitomas y Paragangliomas de glándula suprarrenal, quistes y tumores sólidos de páncreas, tumores neuroendocrino

pancreáticos, tumores del saco endolinfático en oído y cistadenomas de epidídimo, entre otros (Figura 13) (Ho y Jonasch, 2014; Varshney et al., 2017).

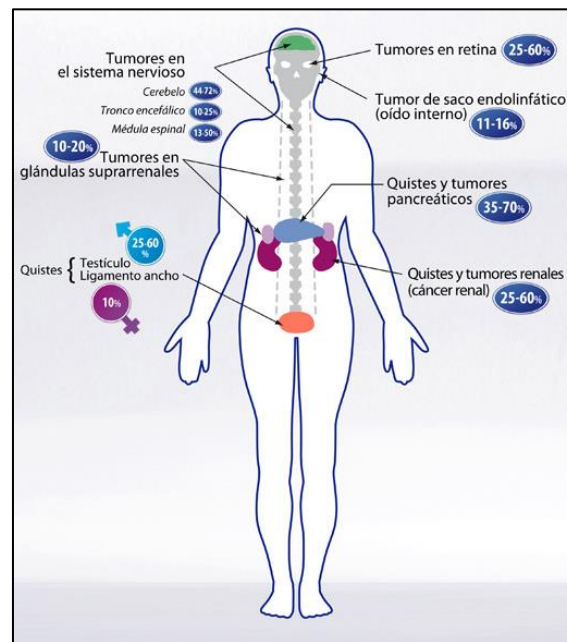


Figura13: Síndrome von Hippel-Lindau- Representación esquemática indicando los principales órganos afectados por el síndrome de von Hippel-Lindau por la formación de tumores y quistes. Se indica además el porcentaje de aparición de cada afección Imagen tomada de la Alianza de Familias de von Hippel-Lindau.

La incidencia del síndrome VHL es de 1 en 36.000 (Nielsen et al., 2016) y tiene una penetrancia mayor al 90% para individuos de 65 años, con una edad promedio de aparición del primer tumor de 26 años (Crespigio et al., 2018; Wilding et al., 2012). La expectativa de vida de los pacientes VHL es de 59,4 años en hombres y 48,4 años en mujeres (Wilding et al., 2012), siendo las causas más frecuentes de muerte complicaciones derivadas de Hemangioblastomas cerebelosos (53%) y de tumores RCC (32%) (Crespigio et al., 2018).

En cuanto a su etiología, esta enfermedad es causada por dos eventos independientes de mutaciones en el gen de VHL. En la forma hereditaria de este síndrome primero ocurre una mutación en la línea germinal del gen de VHL (primer hit) que genera que los individuos pierdan un alelo de VHL en todas las células de su cuerpo. Posteriormente en aquellos tejidos que son propensos al desarrollo de la enfermedad, ocurre una inactivación del alelo restante (segundo hit) por mutaciones puntuales, deleciones o hipermetilación del promotor (Prowse et al., 1997; Varshney et al., 2017). Si bien la enfermedad es autosómica recesiva por requerir la pérdida de ambos alelos de VHL, clínicamente es considerada dominante debido a que la aparición de la segunda mutación está virtualmente garantizada (Ohh y Kaelin, 2003; Tarade y Ohh, 2018). También se ha reportado que en un 20% de los casos, la pérdida o disfunción

de ambas copias del gen de VHL es forma espontánea (Nielsen et al., 2016; Nordstrom-O'Brien et al., 2010; Varshney et al., 2017). Estas mutaciones pueden reducir la expresión de VHL (deleciones, cambios en el marco de lectura o cambio en sitio de splicing) o llevan a la expresión de una proteína VHL anormal (mutaciones puntuales), cuyo efecto sobre la función de VHL está dado por el impacto que tiene esa mutación en la estructura tridimensional de la proteína (Frantzen et al., 1993; Nielsen et al., 2016) (Figura 14).

Tal como fue mencionado previamente, la pérdida total o parcial de la función de VHL produce una actividad descontrolada de los factores HIF-1 y HIF-2, emulando una respuesta transcripcional típica de la hipoxia (pseudohipoxia) (Figura 14). En este sentido, la constante actividad de la vía de señalización de VEGF (Figura 14), entre otros factores pro-angiogénicos, produce tumores altamente vascularizados (Kaelin, 2017; Siemeister et al., 1996; Wizigmann-Voos et al., 1995).

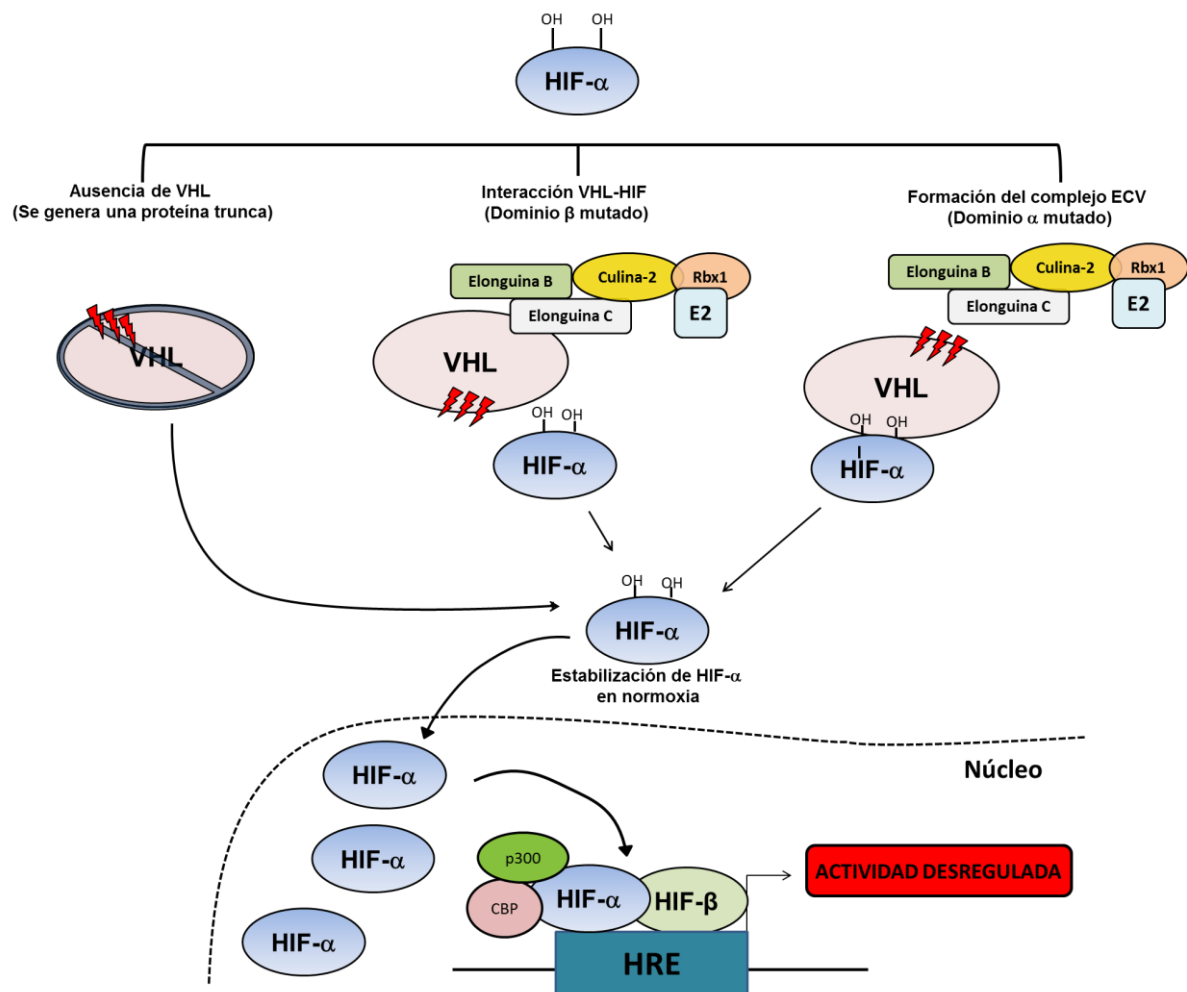


Figura 14: En el síndrome de VHL la actividad de HIF se desregula. En la enfermedad de VHL se producen mutaciones en el gen de VHL que impiden la adecuada regulación de HIF-α en normoxia. Las mutaciones (esquemáticas con símbolos rojos) pueden: generar una versión trunca de la proteína, que no se expresa, afectar el reconocimiento de HIF (mutantes en el dominio β) o comprometer el reclutamiento de las proteínas del complejo ECV,

necesario para la función E3 ligasa de Ubiquitina (mutaciones en el dominio α). Se observan distintos grados de estabilización de HIF y de la inducción de genes de la respuesta a hipoxia.

La enfermedad de VHL ha demostrado ser muy variable en cuanto a su desarrollo, ya sea a nivel intra como interfamiliar (Nielsen et al., 2016). Históricamente, se ha establecido un criterio de clasificación del síndrome que se basa en los hallazgos observados en la clínica, como es el desarrollo de Feocromocitomas (Neumann y Bender, 1998; Nordstrom-O'Brien et al., 2010; Ong et al., 2007). Sin embargo, los avances que se han obtenido en el estudio de las mutaciones de VHL asociadas a cada subgrupo de la enfermedad han permitido correlacionar un genotipo dado con fenotipo (Nielsen et al., 2016; Nordstrom-O'Brien et al., 2010; Varshney et al., 2017). VHL Tipo 1, presenta muy bajo riesgo de presentar Feocromocitomas y se encuentra asociado a deleciones o mutaciones puntuales en el gen de VHL que generan una proteína trunca no funcional. El VHL Tipo 2, presenta Feocromocitomas y basado en el riesgo de generar otros tipos de tumores se ha subdividido en 2A (bajo riesgo de RCC), 2B (alto riesgo de RCC) y 2C (solo generan Feocromocitoma) (FJ et al., 2014; Maher et al., 2011) (Tabla 1). El síndrome de VHL Tipo 2 se encuentra asociado a la presencia de mutaciones puntuales en VHL, que generan una proteína cuya función está parcial o completamente comprometida (Ding et al., 2014; Hacker et al., 2008; Hoffman et al., 2001; Ohh y Kaelin, 2003; Rechsteiner et al., 2011; Yang et al., 2013).

Clasificación de VHL	Presentación Clínica	Tipo de Mutación
<i>Tipo 1</i>	<i>RCC Hemangioblastoma</i>	<i>Delección, mutación puntual (sin sentido, cambio en marco de lectura)</i>
<i>Tipo 2^a</i>	<i>Hemangioblastoma Feocromocitoma</i>	<i>Mutación puntual "missense"</i>
<i>Tipo 2B</i>	<i>RCC Hemangioblastoma Feocromocitoma</i>	<i>Mutación puntual "missense"</i>
<i>Tipo 2C</i>	<i>Feocromocitoma</i>	<i>Mutación puntual "missense"</i>

Tabla 1: Clasificación del síndrome VHL según las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Se indica la clasificación en Tipo 1, Tipo 2 (A, B y C). Para cada una de las categorías se muestran los tumores que pueden presentar los pacientes. Si bien no tiene valor pronóstico, se muestran las mutaciones que se asocian a cada Tipo de la enfermedad VHL.

Se ha reportado que cada uno de los fenotipos descriptos para el síndrome de von Hippel-Lindau presenta una fuerte correlación con los niveles de actividad de HIF. Se observa una mayor actividad de HIF tanto para VHL Tipo 1 como Tipo 2 B, fenotipos

que presentan mayor predisposición a la formación de tumores del tipo RCC. Por otro lado, aquellos fenotipos que presentan baja o nula predisposición a la formación de tumores RCC, Tipo 2A y 2C, se caracterizan por menor actividad transcripcional de HIF. De hecho el fenotipo 2C se comporta prácticamente como el fenotipo salvaje, respecto a los niveles de HIF (Hoffman et al., 2001; Kaelin, 2008) (Figura 15). En línea con lo dicho, hay reportes que muestran que algunos mutantes de VHL del Tipo 2, a diferencia del Tipo 1, retienen parcialmente la actividad de VHL respecto a la regulación de los niveles de HIF (Hacker et al., 2008; Hoffman et al., 2001; Rechsteiner et al., 2011). Esto ha generado la necesidad de encontrar otros mecanismos moleculares que llevan a que estas mutaciones en VHL desarrollen el fenotipo tumoral asociado a esta enfermedad, lo que ha sido en parte explicado por las funciones de VHL independientes de HIF (Zhang y Zhang, 2018).

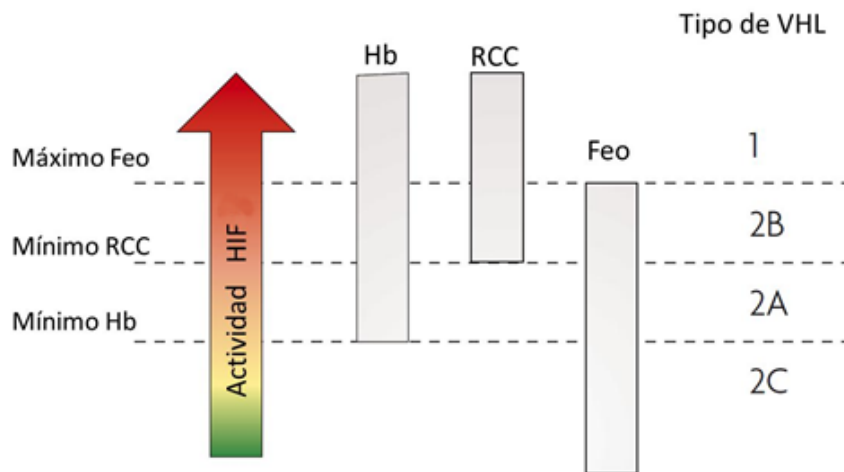


Figura 15: Correlación entre actividad de HIF y fenotipos tumorales VHL. Se indica la actividad transcripcional de HIF observada en los distintos subtipos del síndrome de von Hippel-Lindau (1, 2A, 2B y 2C), así como el rango de niveles de HIF en los que se desarrollan tumores característicos del síndrome: Hemangioblastoma (Hb); Carcinoma Renal de células Claras (RCC) y Feocromocitoma (Feo). Se observa mayor actividad transcripcional de HIF los fenotipos 1 y 2B que presentan alta predisposición a la formación de tumores RCC, mientras que baja actividad en los fenotipos 2A y 2C, que no presentan RCC. El desarrollo de Hemangioblastomas requiere de menor actividad de HIF que para el fenotipo RCC. Por su parte, niveles elevados de HIF no son compatibles con el desarrollo de Feocromocitomas. Imagen adaptada de Nature Reviews (Kaelin, 2008).

VII.1 Seguimiento clínico y estrategias terapéuticas

En la actualidad, a pesar de la gran cantidad de mutaciones que se han encontrado en VHL, no es posible identificar cuál o cuáles serán los tumores que desarrollará un paciente (Nielsen et al., 2016). De hecho, no se han encontrado biomarcadores que permitan llevar a cabo un tratamiento preventivo de la aparición de tumores asociados a VHL. En este sentido, se han establecido protocolos de “vigilancia” de los pacientes,

mediante interdisciplinarios, que llevan a mejorías en la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad (Evans et al., 1997; Frantzen et al., 1993; Nielsen et al., 2016; Priesemann et al., 2006).

La primer estrategia a utilizar con los tumores asociados a la enfermedad VHL es el seguimiento periódico de los mismos y la intervención quirúrgica cuando por su tamaño comprometan otras estructuras circundantes (Barata et al., 2017; Crespigio et al., 2018; Varshney et al., 2017). Debido a que los tumores RCC pueden ser sumamente agresivos, generando metástasis a otros tejidos, (Barata et al., 2017; Chittiboina y Lonser, 2015), se ha buscado intervenir en el desarrollo tumoral a otros niveles (Maher et al., 2011). En este sentido, la caracterización a nivel molecular de la enfermedad de VHL ha permitido desarrollar estrategias terapéuticas que actúan sobre los factores que se encuentran desregulados por la pérdida de función de VHL. Por un lado se han desarrollado inhibidores de la proliferación celular, que afectan la actividad de mTOR (Temsilolimus y Everolimu) (Chen et al., 2016; Kaelin, 2017; Patel et al., 2009; Patel et al., 2006). Por otro, considerando la importancia de la neovascularización tumoral para su crecimiento (Hanahan y Folkman, 1996), se han desarrollado drogas que impactan en la vía de VEGF. El anticuerpo monoclonal contra VEGF (bevacizumab) es actualmente utilizado en numerosos tumores, entre ellos, los tumores metastásicos RCC (Toledo, 2017). Posteriormente, como estrategia complementaria, se aprobó la utilización de inhibidores de los receptores de VEGF (VEGFRs) (Axitinib, Sunitinib, sorafenib, pazopanib, lenvatined y cabozantinib). A pesar del gran avance que significó el desarrollo de estos inhibidores de la angiogénesis, la existencia de vías alternativas a los factores VEGF, generan resistencia tumoral a las terapias propuestas (Barata et al., 2017; Coleman y Ratcliffe, 2009; Hlushchuk et al., 2011; Jonasch et al., 2012).

En tumores RCC el factor HIF-2 en particular, es quien contribuye a procesos oncogénicos como la angiogénesis, reprogramación del metabolismo celular, proliferación celular y la metástasis (Kaelin, 2017; Keith et al., 2011). Actualmente ha habido avances en el desarrollo de inhibidores de la actividad transcripcional de HIF-2 (PT2385, PT2399 y el compuesto 76) que impiden la formación del dímero HIF-2 α /HIF- β (Metelo et al., 2015; Toledo, 2017). Aunque estos compuestos han mostrado inhibir el efecto de la pérdida de VHL, en líneas celulares, en modelos tumorales RCC en ratones y en cultivos primarios derivados de tumores de pacientes (Kaelin, 2017), se ha encontrado resistencia en tumores RCC derivados de algunas mutantes de VHL (Chen et al., 2016; Cho et al., 2016), indicando la necesidad de encontrar otros moduladores de la actividad de VHL.

VII.2 Antecedentes del efecto de RSUME sobre VHL y HIF

Tal como se ha mencionado, en nuestro laboratorio se ha estudiado desde hace tiempo la función de RSUME sobre HIF. En un principio se la encontró asociada a la estabilización y actividad de HIF-1 α en hipoxia (Carbia-Nagashima et al., 2007). Sumado a que RSUME se expresa en tejidos que en el contexto de la enfermedad VHL desarrollan tumores dependientes de la elevada actividad de HIF (Figura 9) (Carbia-Nagashima et al., 2007), estudiamos la acción de RSUME sobre la estabilidad de HIF-1 α en normoxia, con foco en la función de la proteína VHL.

Inicialmente, se estudiaron los efectos de RSUME sobre la estabilidad de HIF-1 α . En este sentido, estos primeros ensayos mostraron que RSUME incrementa la estabilidad (Figura 16A) y actividad (Figura 16B) de HIF-1 α incluso frente a la sobre-expresión de VHL (Gerez et al., 2015 y Tesis licenciatura Lucas Tedesco).

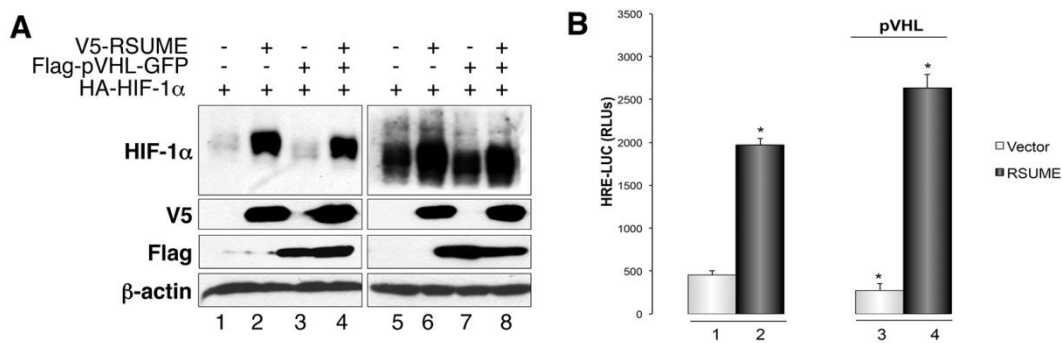


Figura 16: RSUME incrementa la estabilidad y actividad de HIF-1 incluso frente a la sobre-expresión de VHL. (A) En células COS-7 transfectadas con HIF-1, RSUME y VHL, según se indica, RSUME aumenta la estabilidad de HIF-1 α ya sea con niveles endógenos de VHL como cuando este se sobre-expresa (Calles 1 a 4). Cuando se trataron células con el inhibidor del proteasoma MG-132 (Calles 5-8), la sobre-expresión de RSUME no modificó significativamente los niveles de HIF, indicando un rol sobre la degradación vía proteasoma. (B) En células transfectadas con el reportero de actividad transcripcional de HIF (HRE-LUC), la sobre-expresión de RSUME resultó en un incremento de la actividad de HIF-1, revirtiendo los efectos de sobre-expresar VHL.

Profundizando en los efecto de RSUME sobre la función de VHL, se determinó que frente a la expresión de RSUME disminuye la ubiquitinación de HIF-1 α , inhibiendo la acción de VHL sobre la estabilidad de HIF-1 α (Figura 17) (Gerez et al., 2015).

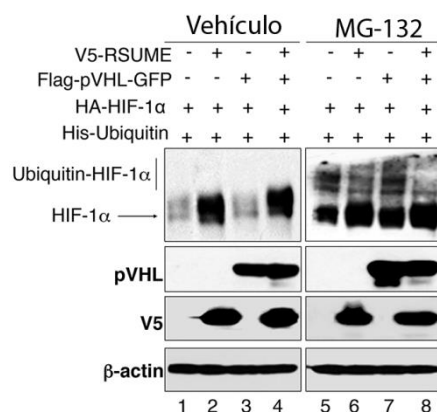


Figura 17: RSUME revierte ubiquitinación de HIF-1 α . En células COS-7 transfectadas con His-Ubiquitina, HIF-1 α , RSUME y VHL, según se indica y tratadas con el inhibidor de proteasoma para detectar a HIF-ubiquitinado, la sobreexpresión de RSUME disminuye la ubiquitinación de HIF-1 α por VHL endógeno y revierte el efecto de la sobreexpresión de VHL.

Posteriormente, los estudios en el mecanismo de acción de RSUME sobre VHL mostraron que VHL y RSUME interactúan, disminuyendo la formación del complejo ECV, E3 ligasa de Ubiquitina (Tesis Licenciatura y Gerez et al., 2015).

Si bien los resultados reportados hasta ese momento indican un efecto de RSUME sobre la función de VHL, no era posible concluir que los efectos observados fueran por una acción directa o sobre un intermediario, objetivo que nos hemos propuesto como parte de la presente Tesis, así como comprender los mecanismos moleculares de RSUME sobre la función de VHL.

Además, considerando el rol preponderante del factor HIF-2 en el establecimiento de tumores asociados a la pérdida de función de VHL y que en particular para los tumores del tipo RCC (los más agresivos en esta enfermedad), HIF-2 tiene efectos pro-tumorigénicos y HIF-1 inhibitorios, hemos enfocado nuestros estudios sobre la función de VHL en la estabilidad y actividad de HIF-2.

Previamente, habíamos encontrado expresión de ARN mensajero de RSUME en tumores VHL analizando muestras de tumores de pacientes, indicando una posible acción en esta enfermedad (Gerez et al., 2015 y Tesis Licenciatura Lucas Tedesco) (Figura 18A).

Apoyando un rol de RSUME en tumores asociados a VHL, en un estudio reciente realizado por “*The Cancer Genome Atlas*” y “*The Human Protein Atlas*” en un set de 528 muestras de tumores RCC, se encontró que 20,07% de los pacientes presentaban elevados niveles de ARN de RSUME. Este incremento correlaciona con una disminución en la supervivencia de los pacientes (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000122481->

[RWDD3/pathology/tissue/renal+cancer](#) y luego seleccionar la pestaña correspondiente a tumores RCC) (Figura 18B).

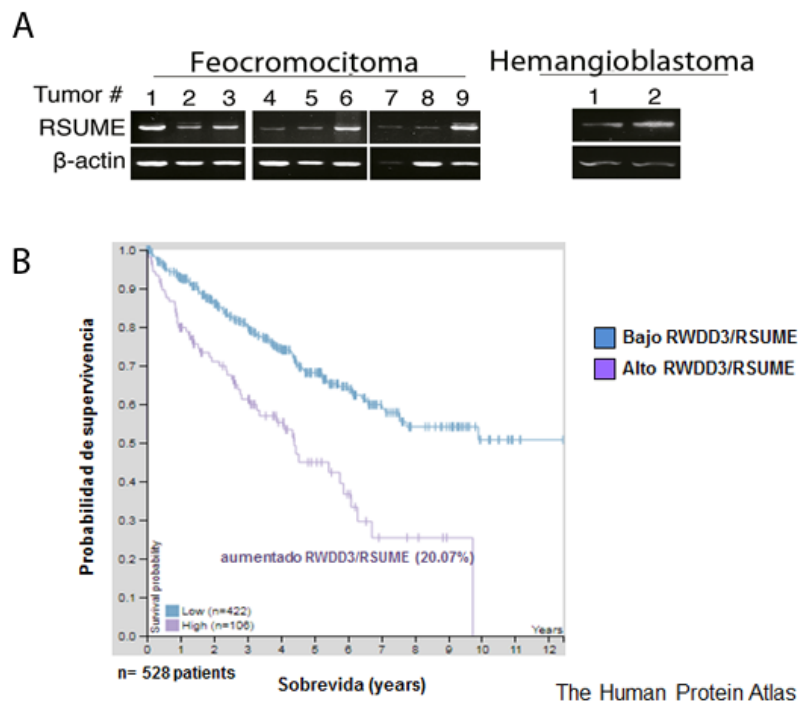


Figura 18: RSUME se expresa en tumores asociados a VHL. (A) En muestras de pacientes con tumores VHL, se encontró expresión de ARN mensajero de RSUME. (B) que Estudio realizado en un set de 528 muestras de tumores RCC que muestra que 20,07% de los pacientes presenta elevados niveles de ARN de RSUME, con una disminución en la sobrevida de los pacientes.

Hasta el momento, en el contexto de la enfermedad de VHL, no se han explorado los mecanismos involucrados en la desregulación de los niveles de RSUME, que es un aspecto que hemos estudiado en la Presente Tesis.

Finalmente, en relación al desarrollo del síndrome VHL, utilizando un reportero de estabilidad de HIF-1, demostramos que RSUME incrementa la pérdida de función de mutantes características de la enfermedad (Gerez et al., 2015 y Tesis Licenciatura Lucas Tedesco). Este hallazgo nos llevó a la pregunta de cuáles son los mecanismos involucrados en la pérdida de función por RSUME y el impacto que tiene sobre el establecimiento y mantenimiento de los tumores dependientes de VHL, ambos abordados en la presente trabajo Tesis.

Objetivos

Objetivo General I:

Analizar el rol de RSUME sobre el aumento de la estabilidad proteica de la subunidad alfa de HIF con foco en la función VHL.

Objetivo Específicos:

- I.I. Analizar si RSUME actúa directamente sobre VHL, afectando su función E3 ligasa de Ubiquitina
- I.II. Caracterizar la interacción RSUME-VHL
- I.III. Estudiar el mecanismo molecular de la pérdida de función de VHL por RSUME

Objetivo General II:

Establecer el impacto de RSUME en el desarrollo tumoral asociado a una actividad transcripcional anormal de HIF característica del síndrome de von Hippel-Lindau, estudiando la función de mutantes características de VHL.

Objetivos Específicos:

- II.I. Estudiar la expresión de RSUME en tumores asociados a la pérdida de función de VHL.
- II.II. Caracterizar el impacto de RSUME sobre la función de mutantes representativas del síndrome VHL.
- II.III. Determinar los mecanismos moleculares asociados a la pérdida de función de las mutantes de VHL
- II.IV. Estudiar el rol de RSUME en el establecimiento del fenotipo tumoral asociado a la pérdida de función de las mutantes VHL, en un modelo celular de la enfermedad.

Materiales y Métodos

I. Aparatos o dispositivos especiales

Incluimos sólo aquellos aparatos que tienen alguna característica específica de aplicación en los experimentos de este trabajo, no aquellos generales como campanas de flujo laminar, freezers o centrifugas.

- Analizador digital para western G:BOX-CHEMI-XT4 (Sygene)
- Cámara de hipoxia ProOx Model 110 (BioSpherix)
- Espectrofotómetro iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad)
- Homogenizador de tejidos ULTRA-TURRAX® dispersers PRO sc-250 (IKA)
- Luminómetro Junior (EG&G Berthold)
- Microscopio AXIO Vert.A1 (Carl Zeiss)
- Microscopio de fluorescencia AxioObserver Z1 LED Colibrí (Carl Zeiss)
- Microscopio de fluorescencia confocal LSM 710 AxioObserver (Carl Zeiss)
- Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- Termociclador DNAEngine (Bio-Rad)
- Sonicador Bioruptor (Next Gen Diagenode)

II. Anticuerpos, estímulos y productos relacionados

Se detallan los principales productos utilizados en este trabajo de tesis y las empresas proveedoras de los mismos.

II.1 Anticuerpos

Abcam: IgG policlonal de conejo anti-RWDD3 (utilizado 1:1000 para WB y 1:200 para inmunohistoquímica); IgG policlonal de conejo anti-V5 (utilizado 1:3000), IgG policlonal de conejo anti-GST (utilizado 1:1000), IgG monoclonal de conejo anti VEGF de ratón clon EP1176Y (utilizado 1:200 para inmunofluorescencia).

BD Pharmingen: IgG policlonal de ratón anti-VHL humano (utilizado 1:5000).

Bio-Rad: IgG-HRP policlonal de cabra anti-conejo (utilizado 1:3000); IgG-HRP policlonal de cabra anti-ratón (utilizado 1:3000).

Cell Signalling: IgG de cabra anti-rata (utilizado 1:10000).

Covance: IgG monoclonal de ratón anti-HA clon 16B12 (utilizado 1:200); IgG monoclonal de ratón anti-6xHis.

Life Technologies Invitrogen: IgG-Alexa Fluor 555 de burro anti-ratón (utilizado 1:200); IgG-Alexa Fluor 488 de cabra anti-conejo (utilizado 1:200); IgG-Alexa Fluor 647 de

cabra anti-ratón (utilizado 1:200), IgG monoclonal de ratón anti-HIF-1A α clon mgc3 (utilizado 1:1000).

Novus Biologicals: IgG policlonal de conejo anti-HIF-2 α (utilizado 1:1000 para WB y 1:200 para inmunofluorescencia).

R&D systems: IgG de cabra anti-CD31 (utilizado 1:500 para inmunohistoquímica), IgG monoclonal de ratón anti-VEGF humano clon 26503R (utilizado 1:1000)

Santa Cruz Biotechnology: IgG monoclonal de ratón anti- β -Actina [C4] (utilizado 1:3000), IgG monoclonal en ratón anti-GFP clon B-2 (utilizado 1:3000 para WB).

Sigma: IgG monoclonal de ratón anti-FLAG clon M2 (utilizado 1:5000).

Hecho en el laboratorio: IgG policlonal de rata anti-RSUME (utilizado 1:1000).

II.2 **Estímulos y otros reactivos/materiales**

Bio-Rad: Marcador de peso molecular para proteínas *Broad range precision marker*, membrana de PVDF, equipos de corrida y transferencia para WB.

Calbiochem: N-ethylmaleimida (NEM) y el inhibidor de proteasoma MG-132.

Corning: Matriz de Membrana Basol, Matrigel, reducida en factores de crecimiento y sin Rojo Fenol.

Life Technologies Invitrogen: DMEM baja y alta glucosa, DMEM sin rojo fenol, Opti-MEM, RPMI 1640, Penicilina-estreptomicina, Geneticina (G418), Tripsina, PBS estéril, Lipofectamina 2000 (lipoFECTAMINE Reagent[®]), agarosa, marcador peso molecular para ácidos nucleicos, proteína A sefarosa, Taq Polimerasa, Taq Polimerasa HiFi.

Merck: Azur-eosina-azul de metileno según Giemsa en solución.

Pierce: kit de quimioluminiscencia Super Signal West Dura.

Polysciences Inc: Polyethylenimine [MW 25,000] (PEI).

PJK: Luciferasa system Beetle-Juice.

Promega: X-gal, Reporter Lysis buffer para luciferasa.

QIAGEN: columnas QIAGEN[®] de afinidad para purificación de ADN plasmídico, resina de níquel Ni-NTA.

Roche: cóctel inhibidor de proteasas.

Sigma-Aldrich: BSA 99% de pureza, L-Glutamina, Membrana de nitrocelulosa de 0,45 o 0,2 μ M de poro, PMSF, Ortovanadato, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), Proteína A-sefarosa, Ampicilina, Kanamicina, Rojo Ponceau, Igepal (NP-40), Tritón X-100, Colchicina.

Para el cultivo de células se utilizaron materiales descartables como botellas de cultivo, placas de Petri, tubos cónicos de centrifuga, criotubos y pipetas de las marcas TTP, GBO, Eppendorf, Axygen y Corning.

III. Cultivos Celulares, Estímulos y Transfecciones

III.1 *Líneas Celulares*

La línea celular **RCC-786-O** (carcinoma renal humano), obtenida por parte de R.Voest (Lolkema et al., 2005).

La línea celular A498 (carcinoma renal humano), obtenida por parte de R. Blaheta (Juengel et al., 2009)

La línea celular **EA.hy926** (línea endotelial inmortalizada de cordón umbilical humano), obtenida por parte de G. Owen y F. Parborel (Edgell et al., 1990).

La línea celular **COS-7** (riñón de mono) fue adquirida en ATCC (American Type Culture Collection) (#CRL-1651).

III.2 *Condiciones de cultivo*

Todas las células fueron incubadas a 37°C, 5% de CO₂. Cada una de las líneas celulares utilizadas fue mantenida en condiciones especiales que se detallan a continuación.

Los medios de cultivo utilizados fueron Dubelcco's Modified Eagle Medium (D-MEM) baja glucosa (glucosa 1mg/l) para las células RCC-786-O, D-MEM alta glucosa (glucosa 4,5mg/l) para las células COS-7 y EA.hy926 y el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) para las células A498. Los medios fueron suplementados con sodio hidrógeno carbonato (2.4g/L) y HEPES (2.2 g/L) y, salvo aclaración precisa, con suero fetal bovino (SFB) previamente decomplementado por calor a 65°C durante 30 min (10% final), penicilina (100U/ml), esptreptomicina (100 mg/ml) y glutamina (4 mM).

Las líneas celulares se mantuvieron en crecimiento realizando pasajes celulares cuando la confluencia de las placas de cultivo alcanzaba un 80-90%, a un ritmo de dos pasajes semanales. Para el pasaje de estas células se utilizó PBS 1X sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, tripsina con EDTA, realizando las diluciones correspondientes.

III.3 **Estímulos**

Hipoxia: Se realizó un cambio de medio a las células por medio DMEM SFB 2% y se las incubó a 37°C con las presiones parciales de los siguientes gases: 1%O₂, 5%CO₂, 94% por 4 horas.

MG-132: Se realizó un cambio de medio a las células por medio DMEM SFB 2% y se agregó inhibidor del proteasoma 5µM en DMSO, diluido en medio de estimulación, por 6hs.

III.4 **Transfecciones de células en cultivo**

Se sembraron en placas de 6 pocillos (35mm de diámetro) en medio de cultivo D-MEM con 10% SFB correspondiente a cada línea celular en una concentración de 160.000 (COS-7) y 180.000 (RCC-786-O y A498) células por pocillo y se dejaron adherir toda la noche en estufa a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente el medio de cultivo fue reemplazado por 1ml de D-MEM sin suplementos y las células fueron transfectadas en un estado de confluencia del 80% agregando los complejos obtenidos de la siguiente manera:

Lipofectamina 2000

Por cada pocillo a transfectar se combinaron hasta 2,0µg de DNA plasmídico con los volúmenes apropiados de Lipofectamina 2000 (Lipofectamine Reagent, Invitrogen, New York, EUA) (4 µl para las células COS-7 y 6 RCC-786-O y las A498) en 500µl de OPTIMEM. Luego de dejar incubar 20 minutos, este volumen se agregó a la monocapa celular, se incubaron las células por 6 horas y se cambió el medio por D-MEM o RPMI completos.

Poli-Etilenimina (PEI)

Por cada pocillo, se combinaron 2,0µg de DNA plasmídico con 12µl de reactivo PEI (1mg/ml) en 100µl de NaCl 150mM. Se mezcló por inversión y se dejó reposar por 15 minutos. Luego se adicionaron los 100 µl a la monocapa celular y se dejó transfectando por 6hs en la estufa a 37°C. Pasado este tiempo se cambió el medio por el D-MEM completo correspondiente a cada línea. Se incubó hasta levantar las células por diferentes tiempos de acuerdo a los ensayos a realizar.

III.5 **Transfecciones estables**

La transfección se realizó en placas de 60mm de diámetro con 2 μ g totales de DNA del vector de expresión correspondiente, transfectadas con Lipofectamina 2000.

A las 48 hs post-transfección se agregó D-MEM 10% SFB conteniendo el antibiótico de selección eucariota Gentamicina (G418). La concentración de antibiótico se estableció previamente plaqueando células RCC-786-O parentales en cantidades crecientes de la droga y se evaluó la muerte celular. El medio de cultivo con antibiótico se cambió cada dos días a lo largo de todo el proceso de selección. Se hizo un pool de las células obtenidas, resistentes al antibiótico.

Se realizaron transfecciones estables con los siguientes vectores de expresión:

VHL shscramble, VHL shRSUME, VHL_{K171R} shscramble, VHL_{K171R} shRSUME, VHL_{L188V} shscramble, VHL_{L188V} shRSUME, VHL_{K171R/L188V} shscramble y VHL_{K171R/L188V} shRSUME. El G-418 fue utilizado en una concentración 600ng/ml para la selección y 300ng/ml para mantenimiento.

IV. **Ensayos de Actividad Luciferasa**

IV.1 **Preparación de extractos celulares**

Las células fueron sembradas en placas de 48 pocillos y transfectadas con HRE–Luc. Para normalizar por diferencias en la eficiencia de transfección y número total de células cosechadas durante la preparación de los extractos, en todos los casos se co-transfectó el plásmido de interés con un plásmido RSV- β -galactosidasa o Gaussia-Luc. Después de 24hs, las células fueron lavadas con PBS y lisadas con 100 μ l de Passive Lysis Buffer (Promega). Las muestras se guardaron a -80°C.

IV.2 **Determinación de la actividad luciferasa**

Los lisados se descongelaron a temperatura ambiente, se trasvasaron a tubos eppendorf, y luego de una centrifugación de 10 min a 12000 g, 20 μ l del sobrenadante fueron mezclados con 100 μ l del kit Beetle-Juice (PJK). La actividad de luciferasa fue medida en un lector de placas.

La determinación de la actividad de Gaussia-Luc se realizó secuencialmente a la determinación de la actividad Luciferasa, utilizando sustrato colenterazina. Brevemente, se agregaron en el tubo donde previamente se había la actividad Luciferasa 100 μ l del sustrato para Gaussia, la determinación se realizó

inmediatamente por 30 segundos. Cabe destacar que la actividad de la Luciferasa de Luciérnaga es inhibida por el Buffer donde se encuentra disuelta la colenterazina.

IV.3 **Determinación de la actividad β -galactosidasa**

Brevemente, en placas de 96 pocillos (fondo plano) se colocaron, por pocillo, 100 μ l de *buffer* β -gal ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 100 mM pH 7,4, MgCl_2 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM, Orto-nitrofenil-galactopiranosido (ONPG) 0,66 mg/ml), y 20 μ l del lisado celular. Se incubó a 37°C hasta el desarrollo de color amarillo. Finalmente, se midió la absorbancia a 415 nm.

V. Manejo de plásmidos

V.1 **Plásmidos utilizados**

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo fueron debidamente chequeados por restricción.

En este trabajo se utilizaron los siguientes plásmidos:

Plásmido	Descripción	Origen
HA-HIF-1 α	Vector conteniendo la región codificante de HIF-1 α humano, río abajo del tag HA, en el plásmido pCDNA3	Cedido por el Dr. J. Pouyssegur
HA-HIF-2 α	Vector conteniendo la región codificante de HIF-1 α humano, río abajo del tag HA, en el plásmido pCDNA3	Addgene #18950
V5-RSUME	Vector conteniendo la región codificante del gen de RSUME195 humano río abajo del tag V5, en el plásmido pCEFL	Clonado en el laboratorio
Flag-VHL-GFP	Vector conteniendo la región codificante del gen de VHL humano fusionado a la proteína fluorescente GFP. Río arriba de VHL se encuentra el tag FLAG. El plásmido donde se ha clonado VHL es el Flag-pCDNA3-GFP	Cedido por el Dr. S. Lee
ODD-Luc	Vector reportero de estabilidad, conteniendo el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) de HIF-1 α fusionado a la Luciferasa, en el plásmido pCDNA3-LUC	Cedido por el Dr. W. Kaelin
HRE-LUC	Vector conteniendo tres sitios de respuesta a HIF HRE en tándem que controlan la expresión del gen de la Luciferasa <i>Firefly</i> . El plásmido donde fue clonado es el pBI-GLV4R	Cedido por el Dr. Van Mier
Gaussia-KDEL	plásmido reportero conteniendo la región codificante de la Luciferasa de <i>Gaussia</i> , a la que se le adicionó una señal de localización en retículo. La proteína se expresa bajo control del promotor CMV del plásmido pBasic	Cedido por el Dr. J. Schülke
CMV- β gal	Vector de expresión de β -galactosidasa, bajo el control del promotor CMV.	Cedido por el Dr. D. Spengler
Gam1	Vector conteniendo la región codificante de Gam1 del virus CELO río abajo del tag Myc, en el plásmido pSG9m	Cedido por la Dra. S. Chiocca
Gam1 mut	Vector conteniendo la región codificante de Gam1 mutante L258,265A del virus CELO río abajo del tag Myc, en el plásmido pSG9m	Cedido por la Dra. S. Chiocca

HA-SUMO-1	Vector conteniendo 291pb de la región codificante de SUMO-1 humano río abajo del tag HA, en el plásmido pcDNA3	Cedido por el Dr. R. Hay
HA-SUMO-2	Vector conteniendo 276pb de la región codificante de SUMO-2 humano río abajo del tag HA, en el plásmido pcDNA3	Cedido por el Dr. R. Hay
6His-SUMO-2	Vector conteniendo la región codificante de SUMO-2 humano río abajo del tag 6xHis, en el plásmido pcDNA3	Cedido por el Dr. M. Treier
6His-Ubiquitina	Vector de expresión de la región codificante del gen de Ubiquitina humano río abajo del tag 6xHis	Cedido por el Dr. M. Treier
RSUME-LUC	Vector que contiene el promotor de RSUME controlando el gen de la Luciferasa de <i>Firefly</i> , en el plásmido pCDNA3-LUC	Clonado en el laboratorio
His-RSUME	Vector conteniendo la región codificante del gen de RSUME195 humano río abajo del tag His. Clonado en el plásmido pQE30 (QIAGEN), para expresar y purificar las proteínas desde bacterias	Clonado en el laboratorio
GST-VHL	Vector conteniendo la región codificante del gen de VHL humano río abajo del tag GST. Clonado en el plásmido pGEX-4T3 (GE Healthcare), para expresar y purificar las proteínas desde bacterias	Clonado en el laboratorio
GST-VHL_{K171R}	Vector conteniendo la región codificante del gen de VHL humano mutada en el sitio de sumoilación (VHL _{K171R}) río abajo del tag His. Clonado en el plásmido pGEX-4T3, para expresar y purificar las proteínas desde bacterias	Clonado en el laboratorio
HA-Cullina2	Vector de expresión del gen de Cullina-2 humano, río abajo del tag HA.	Cedido por el Dr. A. Schoenfeld
HA-Elonguina B	Vector de expresión del gen de Elonguina B humano, río abajo del tag HA.	Cedido por el Dr. A. Schoenfeld
Flag-Elonguina C	Vector de expresión del gen de Elonguina C humano, río abajo del tag Flag.	Cedido por el Dr. A. Schoenfeld
Flag-VHL_{Y112H}-GFP	Vector expresando la mutante de VHL (VHL _{Y112H}), fusionada a la proteína fluorescente GFP. Río arriba de VHL se encuentra el tag FLAG.	Clonado en el laboratorio
Flag-VHL_{R167Q}-GFP	Vector expresando la mutante de VHL (VHL _{R167Q}), fusionada a la proteína fluorescente GFP. Río arriba de VHL se encuentra el tag FLAG.	Clonado en el laboratorio
Flag-VHL_{L188V}-GFP	Vector expresando la mutante de VHL (VHL _{L188V}), fusionada a la proteína fluorescente GFP. Río arriba de VHL se encuentra el tag FLAG.	Clonado en el laboratorio
Flag-VHL_{K171R}-GFP	Vector expresando la mutante de VHL (VHL _{K171R}), fusionada a la proteína fluorescente GFP. Río arriba de VHL se encuentra el tag FLAG.	Obtenido en este trabajo
Flag-VHL_{Y112H/K171R}-GFP	Vector expresando la mutante de VHL (VHL _{Y112H/K171R}), fusionada a la proteína fluorescente GFP. Río arriba de VHL se encuentra el tag FLAG.	Obtenido en este trabajo
Flag-VHL_{R167Q/K171R}-GFP	Vector expresando la mutante de VHL (VHL _{R167Q/K171R}), fusionada a la proteína fluorescente GFP. Río arriba de VHL se encuentra el tag FLAG.	Obtenido en este trabajo
Flag-VHL_{L188V/K171R}-GFP	Vector expresando la mutante de VHL (VHL _{L188V/K171R}), fusionada a la proteína fluorescente GFP. Río arriba de VHL se encuentra el tag FLAG.	Obtenido en este trabajo
Flag-VHL-GFP shscramble	Vector de expresión para VHL fusionado a GFP hacia el C-terminal y Flag en N-terminal, que además contiene un cassette de expresión para un shRNA control (scramble)	Obtenido en este trabajo
Flag-VHL-GFP shRSUME	Vector de expresión para VHL fusionado a GFP hacia el C-terminal y Flag en N-terminal, que además contiene un cassette de expresión para un shRNA contra RSUME	Obtenido en este trabajo

Flag-VHL_{K171R}-GFP shscramble	Vector de expresión para VHL _{K171R} fusionado a GFP hacia el C-terminal y Flag en N-terminal, que además contiene un cassette de expresión para un shRNA control (scramble)	Obtenido en este trabajo
Flag-VHL_{171R}-GFP shRSUME	Vector de expresión para VHL _{K171R} fusionado a GFP hacia el C-terminal y Flag en N-terminal, que además contiene un cassette de expresión para un shRNA contra RSUME	Obtenido en este trabajo
Flag-VHL_{L188V}-GFP shscramble	Vector de expresión para VHL _{L188V} fusionado a GFP hacia el C-terminal y Flag en N-terminal, que además contiene un cassette de expresión para un shRNA control (scramble)	Obtenido en este trabajo
Flag-VHL_{L188V}-GFP shRSUME	Vector de expresión para VHL _{L188V} fusionado a GFP hacia el C-terminal y Flag en N-terminal, que además contiene un cassette de expresión para un shRNA contra RSUME	Obtenido en este trabajo
Flag-VHL_{L188V/K171R}-GFP shscramble	Vector de expresión para VHL _{L188V/K171R} fusionado a GFP hacia el C-terminal y Flag en N-terminal, que además contiene un cassette de expresión para un shRNA control (scramble)	Obtenido en este trabajo
Flag-VHL_{L188V/K171R}-GFP shRSUME	Vector de expresión para VHL _{L188V/K171R} fusionado a GFP hacia el C-terminal y Flag en N-terminal, que además contiene un cassette de expresión para un shRNA contra RSUME	Obtenido en este trabajo
Flag-ERα	Vector de expresión conteniendo la región codificante del gen del receptor de estrógenos alfa (ER- α), río abajo del tag Flag. Vector (pCDNA3).	Cedido por el Dr. R. Karas
Flag-p160	Vector de expresión conteniendo la región codificante del gen de la proteína co-moduladora de la transcripción p160, río abajo del tag Flag. Vector (pCDNA3).	Cedido por el Dr. S. Yuzuru
V5-Ubc9	Vector conteniendo la fracción codificante del gen de Ubc-9 humano, río abajo del tag V5	Cedido por el Dr. R. Hay

Tabla 1: Descripción de los plásmidos utilizados en este trabajo, indicando el nombre con que se nombran a lo largo de la Tesis, una breve descripción de plásmido y su origen.

V.2 Preparación de Bacterias Competentes.

Se siguió el protocolo de transformación descrito por Sambrook (Sambrook y Russell, 2001). Bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α fueron utilizadas como fuente de bacterias competentes. Para alcanzar la competencia, las bacterias fueron sembradas en una placa de LB-agar libre de antibiótico, suficientemente diluidas como para obtener colonias individuales, e incubadas a 37°C por 16 hs. Una colonia fue picada y crecida durante 16 hs en 5 ml de medio LB en agitación (200 rpm, 37°C). Una vez alcanzada la saturación, se inocularon 200 ml del LB nuevo que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 600 nm para estimar el crecimiento del cultivo. Luego se centrifugó por 10 min a 3000 rpm y el pellet bacteriano se resuspendió en 100 ml de cloruro de calcio 100 nM preenfriado en hielo. La suspensión de bacterias se centrifugó nuevamente a 4°C por 10 min a 3000 rpm. El pellet fue resuspendido en 5 ml de cloruro de calcio 100 nM e incubado en hielo por 30 min. Posteriormente 200 μ l de la suspensión de bacterias fueron alicuotadas en tubos

eppendorf con el agregado de glicerol hasta alcanzar una concentración final del 15 %. Finalmente las bacterias fueron conservadas a -80°C .

V.3 ***Transformación Bacteriana y Aislamiento de Plásmidos***

Se siguió el protocolo de transformación descrito por Sambrook (Sambrook y Russell, 2001) modificado a partir del original de Hanahan (Hanahan, 1983).

50-100 μl de bacterias competentes DH5 α de eficiencia al menos 1×10^6 colonias/ml, almacenadas a -80°C fueron descongeladas lentamente en hielo granizado. Una vez que descongeladas se agregaron entre 50 ng y $1\mu\text{g}$ de plásmido, y se las incubó 30 min en hielo. Luego se les aplicó un shock térmico de 90 segundos a 42°C y nuevamente se las colocó en hielo. Luego se agregaron 700 μl de medio LB sin antibiótico durante 45-60 min a 37°C . Finalmente, se tomaron cantidades variables de bacterias en LB (entre 50-500 μl), dependiendo de la calidad y cantidad inicial del plásmido y se plaquean en placas de LB con el antibiótico correspondiente.

V.4 ***Preparación de Plásmidos a Pequeña Escala o Minipreparaciones.***

Se utilizó el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979). 2 ml de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente fueron inoculados con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés. Los cultivos fueron mantenidos por 20 hs a 37°C en agitación a 200 rpm. Luego, fueron trasvasados a tubos tipo eppendorf y centrifugados a 2000 rpm 5 min. El pellet celular fue resuspendido en 300 μl de P1 (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM) conteniendo RNAsa A (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Luego 300 μl de P2 (NaOH 0.2N; SDS 1%) fueron agregados, mezclados por inversión y mantenidos por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 300 μl de P3 (KAcO 3M pH 5.2) fría, se incubó la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. 700 μl del sobrenadante fueron precipitados con un volumen de isopropanol, y el pellet se lavó con 1 ml de etanol 70%. El pellet finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 μl de H_2O .

V.5 ***Preparación de Plásmidos a gran Escala o Maxi-Megapreparaciones.***

Una vez chequeados los plásmidos de estas colonias, se repicó una colonia para crecer en 200 ml de LB líquido conteniendo el antibiótico correspondiente y realizar una preparación en gran escala de ADN plasmídico. Este cultivo fue crecido toda la noche a 37°C con agitación hasta llegar a saturación. Luego se centrifugó a 3000 rpm

por 10 minutos a 4 °C. Las bacterias transformadas se procesaron de acuerdo a las instrucciones para la preparación de plásmidos con el kit de QIAGEN. Esta preparación se basa en la lisis alcalina y enzimática de las bacterias y la posterior purificación del plásmido a partir del lisado mediante una columna cromatográfica que une específicamente ADN plasmídico. Como resultado de este procedimiento se obtienen grandes cantidades (100 µg ~ 500 µg) de plásmido con un alto grado de pureza.

V.6 ***Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción***

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo fueron chequeados mediante mapeos por enzimas de restricción. Para ello, DNA plasmídico proveniente de varias minipreparaciones fue sometido a digestión por enzimas de restricción siguiendo el siguiente protocolo: 2-3 µl de DNA plasmídico, 2 µl de buffer de restricción, 0,5 U de la enzima de restricción escogida y H₂O hasta completar 20 µl de volumen final. Las mezclas fueron incubadas durante 2 hs a 37°C. Luego fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa de entre 0,6-2% en buffer TBE (Tris-HCl 25mM, Ácido Bórico 100mM; EDTA10mM, pH: 8.0) con bromuro de etidio. El porcentaje final de agarosa de los geles fue determinado según el tamaño de las bandas esperadas. Finalmente las bandas fueron puestas de manifiesto mediante exposición a UV y se determinó si el tamaño de la banda obtenida era correspondiente a lo esperado.

VI. **Clonado de plásmidos**

VI.1 ***Construcción de vectores de expresión Flag-VHL-GFP ShScramble o ShRSUME***

A fines de unificar en un único vector de expresión los cassettes correspondientes a Flag-VHL-GFP o las mutantes puntuales utilizadas, descritas en la sección Resultados, junto con el cassette de expresión correspondiente al silenciamiento de RSUME o su control, ShRSUME o ShScramble, respectivamente, se diseñó el siguiente protocolo de clonado.

Se realizó sobre el vector de expresión pCDNA3-GFP, conteniendo Flag-VHL.

VI.1.1 Obtención de Flag-VHL-GFP conteniendo mutaciones puntuales

VI.1.1.1 Diseño de primers para mutantes puntuales

Para obtener las mutantes puntuales de VHL, utilizando VHL-GFP como molde, se realizó un protocolo de PCR para generar mutaciones puntuales.

En este sentido, se analizaron las secuencias del plásmido, de VHL y GFP y se diseñaron por un lado un par de primers que abarcan la región río arriba del sitio de las mutaciones de VHL y río debajo de las mismas en la región correspondiente a GFP (VHL-mut P1 y VHL-mut P2, respectivamente) (Figura19).

Primers VHL-mut

P1: 5` CGAGGAGGAGATGGAG 3`

P2: 5` AGGACAGTGGGAGTGGC 3`

Estos primers se diseñaron de modo tal que el fragmento resultante tuviera los sitios de corte para las enzimas de restricción *NotI*, en VHL río arriba de las mutaciones y *HindIII* en GFP. Esto permite insertar en forma direccionada el fragmento de interés (Figura 19).

A su vez, para desarrollar la mutación puntual en VHL se diseñaron primers complementarios a VHL, salvo por el nucleótido responsable de la mutación puntual (Señalado en Rojo). Estos primers a su vez resultan complementarios entre sí.

Primers mutaciones puntuales VHL

Y112H-P1: 5` CACAGCCACCGAGGTCA 3`

Y112H-P2: 5` TGACCTCGGTGGCTGTGGA 3`

R167Q-P1: 5` TGTCCAGAGCCTAGTC 3`

R167Q-P2: 5` GACTAGGCTCTGGACAACC 3`

L188V-P1: 5` AAGATGTGGAAGACC 3`

L188V-P2: 5` GGTCTTCCACATCTTCG 3`

VI.1.1.2 Mutaciones puntuales por PCR

Para obtener el fragmento conteniendo la mutación sobre VHL, flanqueado por los sitios de corte *NotI* y *HindIII* se recurrió a dos rondas sucesivas de PCR. La primera de ellas utilizando uno de los primers de los extremos con su correspondiente primer interno conteniendo la mutación (Figura 19) (ej: VHL-mut-P1 y L188V-P2/VHL-mut-P2

y L188V-P1). Se realizó la reacción de PCR incubando 200 μM de cada dNTP, 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de cada primer, MgSO_4 1,5 mM, TAQ-HiFi polimerasa (Invitrogen) en un volumen final de 25 μl en un termociclador con el siguiente programa:

1- 95 °C 3 min (desnaturalización inicial)

2-Desnaturalización	95°C	1 min	x10ciclos
3-Hibridación	57°C	30 seg	
4-Elongación	68°C	1 min	
5-Elongación final	72 °C	10 min	

Los productos de PCR son los dos extremos del fragmento a insertar el vector por separado, por lo tanto, siendo los primers internos complementarios entre sí, se mezclaron los productos de cada una de las PCR anteriores, como templado, en un volumen final de 5 μl , haciendo diluciones de 1/10 ó 1/50. Se agregaron a esto los componentes necesarios para la PCR: 200 μM de cada dNTP, 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ cada uno de los primers (VHL-mut), MgSO_4 , 1,5 mM, TAQ-HIFI polimerasa (Invitrogen) y buffer apropiado en un volumen final de 25 μl en un termociclador con el siguiente programa:

1- 95 °C 3 min (desnaturalización inicial)

2-Desnaturalización	95°C	1 min	x29ciclos
3-Hibridación	57°C	30 seg	
4-Elongación	68°C	1 min	
5-Elongación final	72 °C	10 min	

En el primer ciclo de la PCR los extremos complementarios correspondientes a los primers diseñados para la primer parte de la PCR son usados como primers (Figura 19) obteniéndose el fragmento completo que luego es templado para los primers VHL-mut. Los productos amplificados se corrieron en gel de Agarosa 1%. Los fragmentos de PCR fueron purificados a partir del gel de agarosa utilizando el Kit QIAEX® (Qiagen, Hylden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

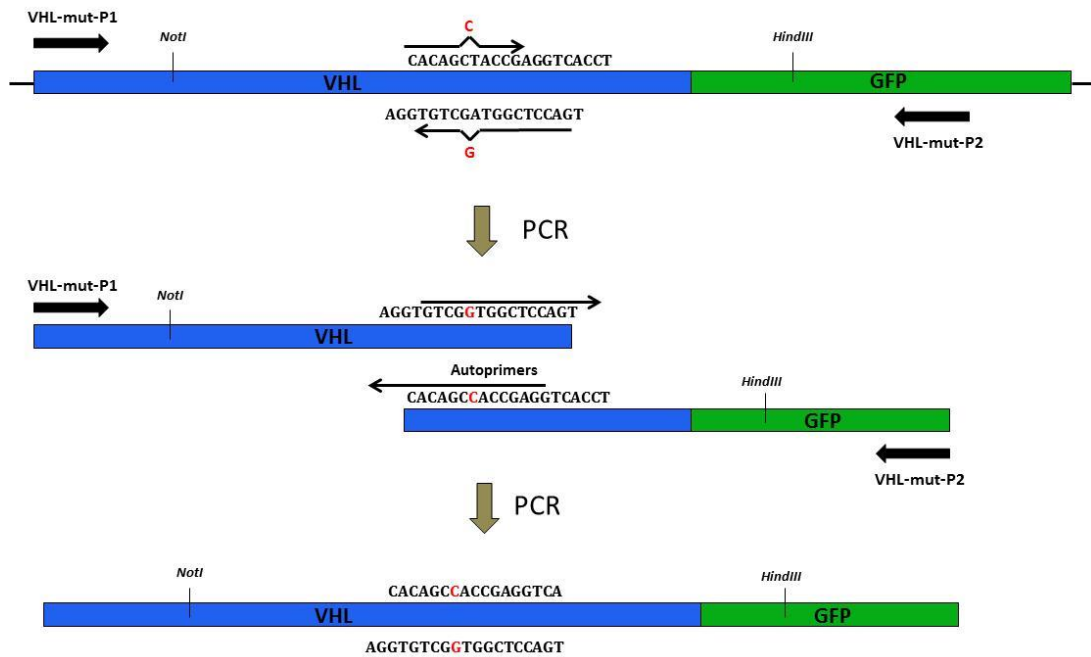


Figura 19: Protocolo de obtención de mutantes puntuales VHL. Esquema representativo del diseño experimental para generar y amplificar los fragmentos conteniendo las mutaciones puntuales en VHL, a insertar en el vector de Flag-VHL-GFP.

VI.1.1.3 Corte con Enzimas de Restricción de los fragmentos purificados y del plásmido molde

Los fragmentos purificados y el vector Flag-VHL-GFP fueron cortados con las enzimas de restricción *NotI* y *HindIII*, aplicando igual protocolo que el mencionado en el apartado *Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción*. Puntualmente, se verificó el Buffer compatible para la combinación de las enzimas. Luego de la incubación a 37° C se incubó durante 15min a 65°C para eliminar la actividad enzimática.

Se purificó el vector cortado a partir de un gel de agarosa utilizando el Kit QIAEX®.

VI.1.1.4 Ligación y chequeo de clonado

Se ligaron los fragmentos conteniendo las mutaciones con el plásmido. Para ello las reacciones de ligación fueron realizadas a 22°C durante 1,5hs, en 20 µl de Buffer de ligación (Tris-HCl 50 mM pH: 7.5; MgCl₂ 7mM; DTT 1 mM), en presencia de ATP 500 µM y 1 U de Ligasa de ADN del fago T4 (Invitrogen). Se probaron distintas relaciones molares inserto-vector y se determinó que la mejor relación para nuestro sistema es 1:4, utilizando 100ng de vector y los correspondientes nanogramos de inserto.

Realizada la ligación, de cada condición se llevó a cabo la transformación bacteriana tal como se explica en el apartado *Transformación Bacteriana y Aislamiento de Plásmidos*. De las colonias se realizaron minipreparaciones y se chequeó la presencia plásmido de interés utilizando las enzimas NotI y HindIII. Estos dos últimos pasos se encuentran descritos en *Preparación de Plásmidos a Pequeña Escala o Minipreparaciones y Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción*, respectivamente.

Los vectores se secuenciaron utilizando el servicio de secuenciación MacroGen. Una vez obtenida la secuencia se realizó un alineamiento con la herramienta BLAST, comparando VHL y GFP con el producto obtenido, a fines de detectar solo diferencias en la mutación puntual.

Para introducir la mutación K171R en las diferentes variantes de VHL, se utilizó como molde cada una de las variantes de VHL en la que se quería introducir la mutación y se siguió el mismo protocolo que el utilizado para generar las mutantes puntuales de la enfermedad de VHL, solo que se utilizaron los siguientes *primers*:

P1: 5` CGAGGAGGAGATGGAG 3`

P2: 5` AGGACAGTGGGAGTGGC 3`

Primers para la mutación K171R

VHL_{K171R} Fw: 5`AGTCAGACCTGAGAATTACAGGAG 3`

VHL_{K171R} Rev: 5`AATTCTCAGGTCTGACTAGGCTCC 3`

VI.2 ***Inserción del cassette de expresión ShRSUME o ShScramble en los plásmido Flag-VHL-GFP***

A los vectores obtenidos (Flag-VHL-GFP, Flag-VHL_{K171R}-GFP, Flag-VHL_{L188V}-GFP y Flag-VHL_{L188V/K171R}-GFP) se le insertó el cassette de expresión de ShScramble o ShRSUME. Para ello, en primera instancia se estudiaron las secuencias de VHL, GFP, el plásmido pCDNA3 y los fragmentos a insertar, buscando sitios de corte para enzimas de restricción para el diseño de los primers. La enzima MluI corta en un único sitio en el vector pCDNA3 sin interferir en las secuencias de interés.

VI.2.1 *Diseño de primers*

Se diseñaron primers a partir de la secuencia del plásmidos conteniendo ShScramble o ShRSUME (GGAGAAGTGGGCTTCAGATTT y GGAATCTCATTTCGATGCATAC , respectivamente (SABiosciences). Con estos primers se amplificaron los shRNA junto

con su promotor. En los extremos de los primers se agregó el sitio de corte para MluI (subrayados). Los primers diseñados fueron los siguientes.

ShRSUME-P1: 5` TAACGCGTGGGCGAATTG 3`

ShRSUME-P2: 5` TTACGCGTTTACGCCAAGCT 3`

Se realizó la PCR utilizando Taq-HiFi, se cortaron el vector e el inserto con MluI y se purificaron desde gel de agarosa tal como se explicó en el apartado *Obtención de Flag-VHL-GFP conteniendo mutaciones puntuales*.

VI.3 **Reacción de Fosfatasa Alcalina de Camarón (SAP)**

Al cortar al plásmido con sólo una enzima de restricción que deja extremos protuyentes, el plásmido puede religarse en forma espontánea, disminuyendo la eficiencia de clonado. Para evitar esto, se utilizó la enzima SAP, fosfatasa que elimina el fosfato del extremo 5` necesario para la ligación. El fragmento de PCR cortado con MluI contiene los fosfatos en 5`, siendo sustrato de la T4-Ligasa. Brevemente, en un volumen total de reacción de 20µl, se agregaron 3µl de ADN, 2µl de Buffer 10X, 1 U de SAP y agua miliQ para llevar a volumen. Se incubó 1h a 37 y luego se eliminó la actividad SAP por 15min a 65°C.

Luego de este paso se continuó con la ligación y chequeos tal como fue descrito anteriormente.

VII. **RNA, transcripción reversa y PCR**

Para aislar RNA de líneas celulares o de muestras de tejido se utilizó el reactivo Tri Reagent (MRC) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras se lisaron en el reactivo, que combina fenol y tiocianato de guanidina, inhibiendo la actividad RNAsa. Luego, se agregó cloroformo que permite la separación del homogenato en fases acuosa y orgánica. El RNA que quedó en la fase acuosa y se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua MilliQ. Para resuspender el RNA, las muestras se congelaron a -80°C; una vez congeladas, se descongelaron a 55°C durante 15min y se agitaron vigorosamente con vórtex, colocándolas en hielo. El RNA se cuantificó utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific). Para controlar la integridad del RNA extraído, se corrieron geles de agarosa 1%*m/v*.

VII.1 **Transcripción reversa**

Para la obtención de DNA copia (cDNA) a partir de RNA, se utilizó la enzima transcriptasa reversa (M-MLV RT, Promega). Se desnaturalizó el RNA incubándolo 5 min a 65°C y pasándolo inmediatamente a hielo para evitar la formación de estructuras secundarias. Luego, se realizó la transcripción reversa (RT) incubando 1 µg de RNA, 500 µM de dNTPs (mezcla equimolar de dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 20 U de RNAsin (Promega), 5 µM de oligo-dT, 300 U de la enzima retrotranscriptasa M-MLV RT y *buffer* apropiado en un volumen final de 20 µl a 37°C durante 1 h. Se inactivó la enzima incubando 5 min a 95°C.

VII.2 **PCR a tiempo final**

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en 25 µl de volumen final. Se utilizaron 1-2 µl de la reacción de RT que contiene el cDNA que actúa como molde de la reacción de PCR. A cada tubo de reacción se le agregaron: 2,5 µl de *buffer* de PCR sin MgCl₂, 1-2 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de la dilución 10 µM de la mezcla de *primers forward* y *reverse*, 0,5 µl de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, Invitrogen); 0,3 µl de enzima Taq DNA polimerasa (5 U/µl, PBL); H₂O c.s.p. 25 µl volumen final. Para las reacciones de clonado se utilizó la enzima Platinum Taq DNA polimerasa HiFi (Invitrogen).

Los programas utilizados fueron ajustados según los *primers* utilizados y el amplicón: 5 min a 95°C, 30-40 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 55-68°C y elongación 68/72°C (1 min/kpb de producto). Los productos de PCR se analizaron en general por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio.

VII.3 **PCR en tiempo real o cuantitativa**

Las reacciones de PCR en tiempo real (*real-time PCR*, qPCR) fueron realizadas en 25µl de volumen final de forma similar a las PCR de tiempo final. Como molde se utilizaron 5µl de una dilución 1:20-50 de la reacción de RT. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante el agregado de Sybr Green 1:30000 (Roche) a la mezcla de reacción, que se realizó en el ciclador CFX96 touch real-time (BioRad).

El programa que se utilizó en todos los casos fue el siguiente: 10min a 95°C, 40 ciclos de 20s a 95°C, 20s a 60 °C y 20s a 72°C, efectuándose la lectura de la fluorescencia al finalizar cada ciclo. Se realizó una curva de disociación térmica (curva de *melting*) para evaluar la especificidad de la reacción. Además, para determinar que sólo existiera un producto de la reacción, alícuotas de los productos de qPCR fueron analizadas en

geles de agarosa 1.5-2% teñidos con bromuro de etidio, corroborándose también la identidad del producto en función del tamaño esperado. Para cada uno de los productos analizados, se realizó una curva de temperatura de hibridación y de concentración de magnesio para determinar las condiciones óptimas de reacción. En cada experimento se realizó una curva de calibración con diluciones al medio seriadas a partir de una mezcla de los cDNA de las reacciones de RT, para evaluar la eficiencia de la reacción de PCR y estimar la cantidad inicial relativa de molde en cada muestra. Las cantidades relativas iniciales del producto de interés fueron normalizadas en cada caso a los valores obtenidos para el cDNA de *RPL19* por el método de Ct.

VII.4 **Primers utilizados**

Se utilizaron los siguientes pares de *primers*

VEGF:

Fw 5' AGCTACTGCCATCCAATCGA 3'

Rev: 5' GGTGAGGTTTGATCCGCATA 3'

RPL19:

Fw 5' CAATGCCAACTCCCGTCAGCAGATC 3'

Rev 5' GTGTTTTTCCGGCATCGAGCCC 3'

VIII. **Muestras tumorales humanas**

Los explantes de Feocromocitomas y el Hemangioblastoma embebido en un taco de parafina fueron brindados por el grupo de la Dra. Barontini del Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños obtenidos R. Gutierrez. Las muestras en parafina de los tumores renales RCC fueron brindadas por el departamento de Urología del Hospital Italiano de Buenos Aires (Centro de referencia de la Alianza VHL). Ambos establecimientos y estudios cumplen con la Declaración de Helsinki de junio de 1964, han sido aprobados por el comité de ética local y se recibió el consentimiento informado por escrito de cada paciente cuyo tejido tumoral se utilizó.

IX. **Western Blot**

IX.1 **Preparación de los extractos celulares**

Una vez finalizado el tiempo de incubación del estímulo, se colocó la placa sobre hielo, se removió el medio de estimulación y las células se lavaron con PBS frío. Las células fueron lisadas en Laemmli buffer 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% m/v SDS, 10%

glicerol y 5% v/v β -mercaptoetanol), sonicadas en un sonicador Bioruptor (Next Gen Diagenode). Los lisados fueron calentados a 95°C por 5 min antes de sembrarlos en geles de poliacrilamida.

IX.2 Preparación de extractos a partir de muestras de tumores

Los explantes de Feocromocitomas y de los tumores obtenidos en el ensayo *in vivo* de tumorigénesis, que se desarrollará más adelante, fueron descongelados en hielo y se les agregó 500 μ l de Laemmli buffer 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% m/v SDS, 10% glicerol y 5% v/v β -mercaptoetanol). Las muestras fueron homogeneizadas mecánicamente con un ULTRA-TURRAX® dispersers PRO sc-250 (IKA), luego se centrifugaron los tubos recuperando el sobrenadante. Los lisados fueron sonicados en un sonicador Bioruptor (Next Gen Diagenode) y calentados a 95°C por 5 min antes de sembrarlos en geles de poliacrilamida.

IX.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electrotransferencia y revelado

Las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida 8-12% desnaturalizantes en buffer Tris-Glicina-SDS (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 0,1% SDS). Para la identificación de los tamaños moleculares, se utilizó el marcador de peso molecular Broad Precision Marker (BioRad). Se realizó la corrida electroforética hasta que cayó el frente de corrida. Una vez finalizada, en general se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m de poro a 100 V durante 1 h en buffer de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 20% metanol). Luego, se tiñeron transitoriamente las membranas con rojo Ponceau para corroborar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana y comparar cualitativamente las masas sembradas en cada calle. Se incubaron las membranas durante 1 hora en agitación con solución de bloqueo Blocking Buffer (Li-Cor Biosystems) o TBS-Tween 0,05% (Tris 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%) con 5% m/v de leche descremada para bloquear el pegado inespecífico.

La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo durante la noche a 4°C en agitación. Las diluciones de los anticuerpos fueron preparadas en la misma solución de bloqueo. Las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 min con TBS-Tween 0,05%.

Para revelar por quimioluminiscencia, se incubó con el anticuerpo secundario de la especie apropiada acoplado a peroxidasa de rabanita (HRP) (Bio-Rad) en una dilución 1:3000 en solución de bloqueo por 1 h a RT en agitación. Luego de tres lavados de 10

min con TBS-Tween 0,05% y un cuarto lavado con TBS, la unión de los anticuerpos fue detectada con el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Dura (Pierce) utilizando un equipo digital G:BOX-CHEMI-XT4 (Sygene).

X. Ensayos de inmunoprecipitación

Para realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación con extractos celulares, las células fueron cosechadas usando 150µl por pocillo de un buffer de lisis pre-enfriado que contiene: 50 mM Tris-Hcl pH 7.4, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 2 mM Ortovanadato, 1 mM PMSF e inhibidores de proteasas. Es importante remarcar que todo el protocolo de co-inmunoprecipitación debe llevarse a cabo en hielo. Luego los extractos fueron agitados por 30 min a 4°C para favorecer la lisis celular. Posteriormente los extractos fueron centrifugados a 12000 xg a 4°C por 30 min, se tomó el sobrenadante y el pellet fue descartado. Una alícuota del sobrenadante fue separada para ser utilizada como extracto crudo o Input, y el resto fue incubado en agitación con proteína A acoplada a Sefarosa, por 1 hora a 4°C. Luego fue descartada la proteína A-Sefarosa y los extractos fueron incubados en agitación con 1µg de anticuerpo por 2 hs a 4°C según se indica. Posteriormente fueron agregados 25µl de proteína A-Sefarosa y tras una incubación en agitación de 1,5 hs a 4°C los pellets conteniendo los precipitados asociados a la resina fueron recuperados y hervidos por 5 min a 95°C previa adición de 1 volumen de Laemmli buffer 2X. Finalmente los inmunoprecipitados fueron resueltos por SDS-PAGE y la detección de proteínas fue realizada por WB utilizando los anticuerpos que se indican.

X.1 Ensayo de Co-inmunoprecipitación en tándem

Las células transfectadas fueron lavadas con PBS frío y sometidas a un protocolo de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-Flag (Sigma), tal como fue descrito. A fines de eluir los precipitados de la resina, este se resuspendió en 100µl de buffer RIPA (50 mM Tris-Hcl pH 7.4, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 2 mM Ortovanadato, 1 mM PMSF e inhibidores de proteasas) y se agregó el péptido 3xFlag en una concentración final de 100 µg/ml. Se incubó, en agitación, durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras recuperando el sobrenadante (fracción eluída). Sobre esta fracción se realizó una segunda ronda de inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-V5, siguiendo los pasos previamente mencionados. Finalmente, se sometieron los inputs y pellets de la 1er y 2da inmunoprecipitación a SDS-PAGE y WB.

XI. Obtención de proteínas recombinantes

His-RSUME

Bacterias *E. Coli* M15 (pREP4) (QIAGEN) transformadas con las construcciones His-RSUME, fueron crecidas toda la noche a 37°C en de 15 ml de medio rico LB con Ampicilina 10 µg/ml y Kanamicina 25 µg/ml. A la mañana siguiente se utilizaron esos 15 ml para inocular 250 ml de medio LB con Ampicilina-Kanamicina y se crecieron las bacterias a 37°C en agitación durante 1 hora. Luego se estimuló la síntesis de la proteína recombinante con IPTG 1 mM durante 4 hs y se cosecharon las bacterias centrifugando 15 minutos a 4000 xg. Las células fueron resuspendidas en 5 ml de buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM; NaCl 300 mM; MgCl₂ 5 mM; Imidazol 20 mM; glicerol 10%; NP-40 1%; β-mercaptoetanol 1 mM; PMSF 1 mM; cocktail inhibidor de proteasas (Roche) 5%; pH 8,0) a 4°C. Se agregó 1 ml de lisozima 10 mg/ml y se incubó 30 minutos en hielo para romper la pared celular. Se lisaron las células sonicando con microtip 4 veces de 10 segundos a 50% de potencia en un Sonicador (Sonic Dismembrator Model 500, Fisher Scientific) en hielo y enfriando el microtip en hielo-etanol entre cada tanda para evitar el calentamiento de las muestras. El debris celular se eliminó por centrifugación 30 minutos a 10.000 xg a 4°C. Luego se agregó 1 ml de resina de agarosa Ni-NTA 50% al lisado, se agitó durante 1 h a 4°C. y se cargó esta suspensión cuidadosamente en una columna. La columna se lavó 4 veces con buffer de lisis y se eluyeron las proteínas recombinantes en 4 fracciones con buffer de elución (Tris-Cl 10 mM; NaCl 100 mM; Imidazol 250 mM; Glicerol 10%; DTT 0,1 mM; PMSF 1 mM; pH 7,5).

GST-VHL y GST-VHL_{K171R}

Las proteínas de fusión GST-VHL y GST-VHL_{K171R} se expresaron en *E. Coli* y purificaron con resina de glutatión-sefarosa 4B (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones de la empresa. La expresión de las proteínas recombinantes se confirmó por WB.

XI.1 ***Pull down de proteínas recombinantes***

Se incubó durante 1 hora a 4°C 2,5 µg de GST o de la proteína de fusión GST-VHL inmovilizada en las bolitas Glutation-Sefarosa con 7,5 µg de la proteína recombinante His-RSUME en GST-binding buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, PMSF 1 mM). Las muestras fueron lavadas 4 veces en binding buffer, hervidas 5 minutos a 95°C en buffer Laemmli 2X y

corridas en un gel de acrilamida con SDS. Las proteínas precipitadas se detectaron por WB

XII. Ensayo de sumoilación *in vitro*

Para los ensayos de Sumoilación *in vitro* se utilizó el kit de sumoilación de LAE Biotech International. Brevemente, los ensayos se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l, en una reacción conteniendo Hepes 20 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP 2 mM, E1 7,5 μ g/ml, EII (Ubc9) 50 μ g/ml, SUMO-1 50 μ g/ml, 1.0 μ g del sustrato correspondiente y 0,5 μ g de His-RSUME recombinante cuando fuere necesario. Las mezclas fueron incubadas durante 1 hora a 30°C y la reacción se detuvo por agregado de buffer de siembra de Laemmli 2X. Las proteínas fueron sometidas a SDS-PAGE y luego a WB.

XIII. Purificación de Niquel para ensayo de sumoilación

Para la purificación con resina de níquel Ni-NTA, las células COS-7 fueron levantadas en PBS 1X, centrifugadas a 3000rpm por 5min y resuspendidas en *buffer* de extracción (Guanidinio-HCl 6M, Tris-HCl 10mM pH 8, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100mM, Imidazol 5mM y Iodoacetamida 10mM). El lisado resultante se sonicó por 10s a una potencia del 25% para disminuir la viscosidad, se agregaron 75 μ l de resina Ni-NTA por condición y se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación. Se utilizó una placa de 10cm de diámetro por condición. Al día siguiente se realizaron centrifugaciones, resuspensiones e incubaciones sucesivas de 5min en agitación con *buffer* de extracción, *buffer* Urea I pH 8 (Urea 8M, Tris-HCl 10mM pH 8, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100mM, Imidazol 5mM y Iodoacetamida 10mM), *buffer* Urea II pH 6.3 (Urea 8M, Tris-HCl 10mM pH 6.3, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100mM, Tritón X-100 0.2%, Imidazol 5mM y Iodoacetamida 10mM) y *buffer* Urea III pH 6.3 (Urea 8M, Tris-HCl 10mM pH 6.3, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100mM, Tritón X-100 0.1%, Imidazol 5mM y Iodoacetamida 10mM). Finalmente se eluyeron las proteínas unidas a la resina de níquel incubando con *buffer* de elusión (Tris-HCl 125mM pH 6.7, 5% SDS, 30% glicerol, β -mercaptoetanol 720mM e Imidazol 200mM) por 20min en agitación. Los eluidos se resuspendieron en Laemmli buffer 2X. Después de calentar a 95°C por 5 min, las muestras fueron centrifugadas a baja velocidad y los sobrenadantes fueron sometidos a WB.

XIV. Ensayo de tubulogénesis *in vitro*

XIV.1 *Obtención de medios condicionados*

Las células estables generadas en las células RCC 786-O fueron sembradas en placas de 6 pocillos, a razón de 1×10^5 células por pocillo. Luego de 24hs el medio fue cambiado por D-MEM suplementado con 2% suero fetal bovino charcolizado. Luego de 72 hs el medio de las células fue colectado, centrifugado a 500g por 5 min y los sobrenadantes recuperados fueron guardados a -80°C hasta su utilización.

XIV.2 *Formación de túbulos*

A pocillos de placa de 96 se les agregaron 60 μl de Matrigel reducido en factores de crecimiento (Corning), que se dejó solidificar por 30 min a 37°C . Las células EA.hy926 se cosecharon, se resuspendieron en los distintos medios condicionados obtenidos a partir de los diferentes clones y se sembraron en los pocillos con Matrigel ($1,5 \times 10^4$ células/pocillo en 100 μl de medio por cada pocillo). Luego de 18hs de incubación a 37°C 5% CO_2 , se visualizaron las estructuras del tipo capilares o tubulares en microscopio de campo claro. Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software ImageJ. Para cada condición, se sembraron tres pocillos y la formación de túbulos se muestra como el promedio de la longitud de las ramificaciones de los tres pocillos. Como control negativo, las células EA.hy926 fueron cultivadas en medio D-MEM 2% suero fetal bovino charcolizado.

XV. Ensayos en animales

Se utilizaron las siguientes cepas de ratones Nod/Scid y Nude (N:NIH (S)-*Foxn1^{nu}*) En todos los casos, los animales fueron criados y manipulados respetando las normas determinadas por el Comité de Ética del Uso y Cuidado del Animal (CICUAL), Universidad de Buenos Aires, Argentina. Los protocolos realizados fueron aprobados por la CICUAL.

XV.1 *Ensayo de angiogénesis in vivo*

Para cada condición, 10^6 células de cada uno de los clones fueron cosechadas en 90 μl of DMEM y 10 del colorante azul de Tripán (Life Technologies). La mezcla fue inyectada intradérmicamente (aguja 27G) en el flanco derecho de ratones macho de la cepa Nod/Scid de entre 6-8 semanas de edad. En el flanco izquierdo se sembraron 100 μl de vehículo (90 μl de D-MEM y 10 μl de azul de Tripán). Luego de 7 días, los

animales fueron sacrificados, la piel fue removida y se fotografiaron las regiones inyectadas con una lupa ZEISS utilizando el software ZEN. Los pequeños y medianos vasos fueron cuantificados utilizando el software ImageJ y la densidad de vasos se calculó como $(\text{vasos}_{\text{células}} - \text{vasos}_{\text{vehículo}}) / \text{Área de la imagen}$.

XV.2 *Tumorigénesis in vivo*

Se utilizaron ratones atímicos nude de 6-8 semanas de vida, provenientes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Para la inyección se utilizaron protocolos ya establecidos en el laboratorio (Castro et al., 2003; Gerez et al., 2015). Brevemente, el día de la inyección, cada clon se levantó con tripsina en medio D-MEM y se contabilizaron 5×10^6 células/condición. Estas fueron resuspendidas en 200 μ l de PBS por ratón e inyectadas en el flanco derecho de los ratones, utilizando una jeringa de 1ml (Terumo® aguja 29G). Se monitoreó el crecimiento de los tumores a partir de las dos semanas post-inyección. Para ello se observó la presencia de un tumor palpable y además se hizo un seguimiento del crecimiento tumoral con mediciones periódicas del diámetro tumoral utilizando un calibre (se determinó el largo del eje mayor y menor del tumor). Además se tomaron fotografías de los ratones periódicamente. Se determinó el volumen tumoral durante el desarrollo tumoral y se determinó el Área Bajo la Curva (AUC), correspondiente a la integral desde el día del inicio del experimento hasta el volumen logrado al momento de sacrificar a los animales. Cuando se sacrificaron los animales, se tomaron muestras para análisis de WB (congelada a -80°C en Laemmli Buffer 2x) y se tomaron fragmentos para la determinación de marcadores por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (congeladas a -80°C).

XVI. Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia

XVI.1 *Inmunofluorescencia*

Para la inmunofluorescencia, las muestras de tumores de los ratones fueron costadas con crióstato ($5\mu\text{m}$). Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído 4% durante 5 minutos y bloqueados en 5% suero de cabra con 0,1% (v/v) de tritón X100 (Sigma Aldrich) por 1h a temperatura ambiente.

Los cortes fueron incubados con los anticuerpos indicados (HIF-2 α o VEGF) a 4°C durante 16 hs. Luego, los cortes fueron lavados e incubados con los correspondientes

anticuerpos secundarios Alexa Fluor® 594 anti-conejo (1:500, Invitrogen) o FITC-488 anti-conejo (Invitrogen) durante 2hs a temperatura ambiente. Luego de lavados con PBS, los cortes fueron teñidos con DAPI y finalmente montados con el medio de montaje Mowiol (Sigma Aldrich). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal (Fluo View™ FV1000, Olympus), utilizando un objetivo 60x. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software ImageJ, midiendo la señal de fluorescencia para HIF-2 α y VEGF, que fue relativizada a la tinción de DAPI. Se analizaron 6 campos para cada uno de los tumores.

Para la muestra de Hemangioblastoma incluida en parafina, esta fue primero desparafinada y rehidratada en soluciones de isopropanol (Isopropanol 100%, 96%, 90%,70%). Se fijó la muestra en PFA al 4% por 15 minutos, a temperatura ambiente. Luego de la fijación se realizaron 3 lavados con PBS y se permeabilizó con Triton-X-100 0,1% durante 10 min. Luego se bloquearon con SFB 1% en PBS durante 1 hora. Se incubó con el anticuerpo primario correspondiente para RSUME durante 16 hs en cámara húmeda a 4°C. Se realizaron 4 lavados con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario (Alexa 647 anti conejo) durante 45 min a temperatura ambiente. Se montó con medio montaje Mowiol. La muestra se analizó en el microscopio de fluorescencia confocal LSM 710 AxioObserver (Carl Zeiss). Las imágenes se adquirieron con el Software ZEN 2011. No se observó fluorescencia en los controles negativos realizados sin anticuerpo primario y en el control de autofluorescencia.

XVI.2 *Inmunohistoquímica*

Para las muestras de tumores de ratones, una vez fijadas como se explicó anteriormente, estas fueron incubadas con anticuerpo anti CD31 (1:500) durante 16 hs a 4°C. Luego de realizar lavados con PBS, las muestras fueron incubadas durante 30min a temperatura ambiente, con el correspondiente anticuerpo secundario biotilnado (1:300). Las muestras fueron incubadas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories Inc.), durante 30min. El revelado se realizó exponiendo las muestras a una solución de diaminobenzidina 1mg/ml con 0,01% de H₂O₂ durante 8 segundos. Como contraste se utilizó azul de toluidina. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo 40x, utilizando un microscopio (Fluo View™ FV1000, Olympus). Se cuantificó la señal positiva para CD31 utilizando el software ImageJ.

XVII. Análisis estadístico

Los datos son mostrados como el valor medio \pm error estándar. Para las comparaciones múltiples, se efectuó un análisis de la varianza (ANOVA) de uno o dos factores en combinación con el test de Scheffe para determinar los grupos que presentaban diferencias significativas entre sí. En todos los casos se consideró un valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

I. CAPITULO I: RSUME interacciona con VHL e inhibe su función como ligasa de Ubiquitina

I.1 RSUME actúa sobre VHL inhibiendo su función E3 Ligasa de Ubiquitina

Como se indicó en la Introducción, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que RSUME incrementa la estabilidad de HIF-1 α incluso al sobreexpresar VHL. Sumado a esto se observó que RSUME disminuye los niveles de HIF1- α ubiquitinado por VHL, indicando una posible inhibición funcional de RSUME sobre VHL (Tesis de Licenciatura de Lucas Tedesco y Gerez et al., 2015).

En primer lugar, estudiamos si RSUME actúa sobre HIF-2 α . En células COS-7 transfectadas con los vectores de expresión HA-HIF-2 α , V5-RSUME y Flag-VHL, al igual que lo observado previamente para HIF-1 α , la sobre-expresión de RSUME aumentó los niveles de HIF-2 α , incluso ante la sobre-expresión de VHL (Figura 20, calle 2 vs. 1 y 4 vs. 3).

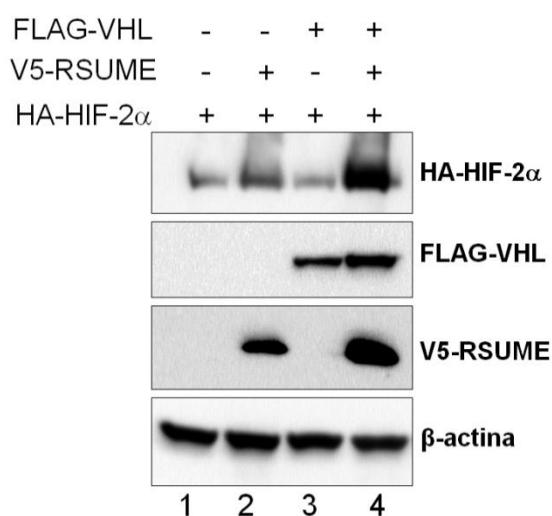


Figura 20: RSUME incrementa los niveles de HIF-2 α en presencia de VHL. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de HA-HIF-2 y/o 0,5 μ g de V5-RSUME y/o 0,5 μ g Flag-VHL-GFP. 48hs post-transfección las células fueron cosechadas en Laemmli Buffer y sometidas a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

Para evaluar si RSUME bloquea la degradación de HIF-2 α por VHL, las células fueron sometidas primero a HPX (VHL no reconoce a HIF y éste se acumula) y luego incubadas a diferentes tiempos de NMX (indicados en la Figura 21). Efectivamente, la exposición a HPX generó un incremento en los niveles de HIF-2 α , revertido por la acción de VHL endógeno y sobre-expresado, en normoxia (Figura 21, calles 9-12 vs. 1-4). RSUME produjo un aumento significativo en los niveles de HIF-2 α en todos los

tiempos de NMX, indicando una vez más, que revierte los efectos de la acción de VHL. (Figura 21, calles 5 a 8 vs. 1 a 4 y calles 13 a 16 vs. 9 a 12).

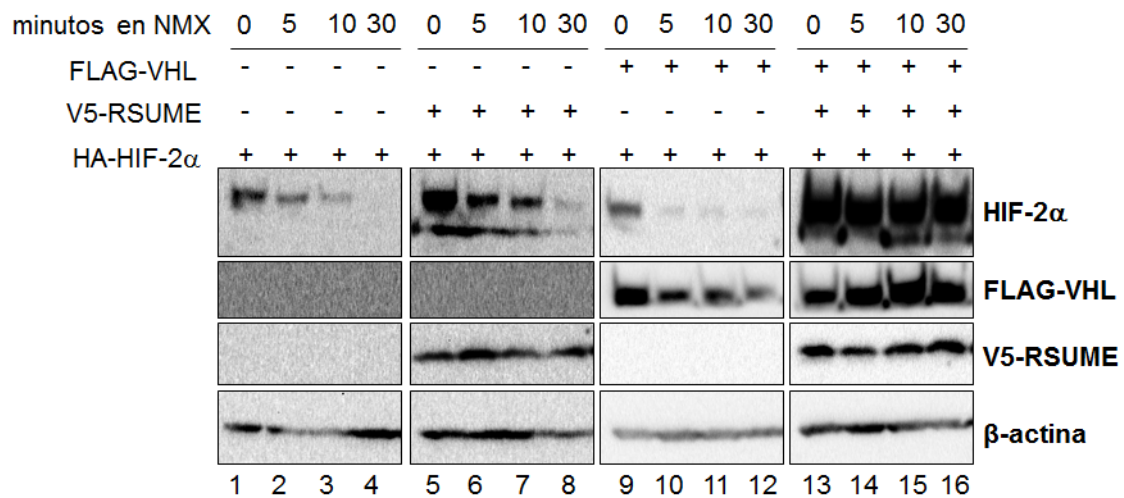


Figura 21: RSUME incrementa el tiempo de vida de HIF-2 α en presencia de VHL. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,2 μ g de HA-HIF-2 y/o 0,5 μ g de V5-RSUME y/o 0,5 μ g Flag-VHL-GFP. 48hs post-transfección las células fueron sometidas a 4hs de HPX (1% de O₂) y los extractos celulares fueron cosechados en Laemmli Buffer a diferentes tiempos de NMX (21% O₂) (0, 5, 10 y 30 minutos). Los extractos fueron sometidos a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de dos ensayos independientes con resultado similar.

El hecho de que RSUME incremente la estabilidad de ambas isoformas de HIF- α refuerza la hipótesis de que RSUME actúa sobre VHL provocando una disminución en su función. El paso siguiente para verificar la dependencia funcional RSUME-VHL fue evaluar el efecto de RSUME sobre la estabilidad de HIF en las células que no expresan VHL. En células RCC-786-O (VHL -/-, HIF-2 α +/+), la sobre-expresión de RSUME no tuvo ningún efecto sobre la estabilidad de HIF-2 α endógeno, mientras que revirtió la degradación producto de la expresión ectópica de VHL (Figura 22, calle 2 vs. 1 y calle 4 vs. 3). Cuando estas células fueron expuestas a HPX RSUME no aumentó los niveles de HIF-2 α (Figura 22, calle 6 vs. 5 y calle 8 vs. 7), ratificando que actúa principalmente sobre la capacidad de VHL de degradar a HIF.

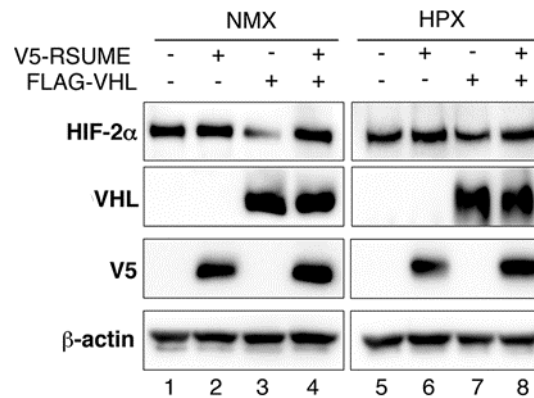


Figura 22: RSUME estabiliza a HIF-2 α solo en presencia de VHL. Células RCC-786-O fueron transfectadas con 0,5 μ g de V5-RSUME y/o 0,5 μ g Flag-VHL-GFP. 48hs post-transfección las células fueron cultivadas en normoxia (NMX) (calles 1 a 4) o hipoxia (HPX) (calles 5 a 8) por 16hs. Las células fueron cosechadas en Laemmli Buffer y sometidas a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

Por otro lado, se evaluó el efecto de RSUME mediante la utilización de un reportero de estabilidad de HIF- α , que consiste en una proteína de fusión conformada por el dominio ODD de HIF-1 fusionado a la Luciferasa (ODD-LUC). Dado que esta proteína se expresa en forma constitutiva, son las variaciones en su estabilidad lo que provoca cambios en la actividad Luciferasa del reportero. La acción de RSUME fue evaluada en las células COS-7 y en RCC-786-O. Verificando que RSUME precisa la expresión de VHL para impactar en HIF, la sobre-expresión de RSUME produjo un aumento en la estabilidad del reportero en las células COS-7 (VHL +/+) (Figura 23, barra 2 vs barra 1) y no en las RCC-786-O (VHL -/-) (Figura 23, barra 4 vs barra 3). En estas últimas, RSUME solo actuó cuando VHL fue expresado, reestableciendo la estabilidad del reportero (Figura 23, barra 6 vs. Barra 5).

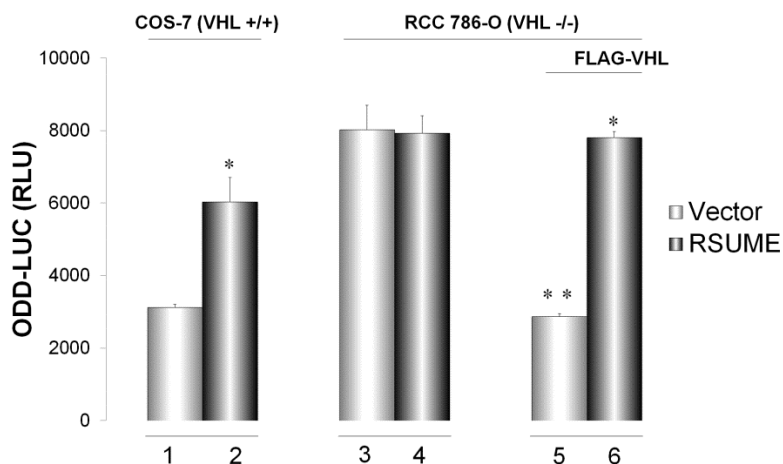


Figura 23: RSUME estabiliza al reportero ODD-LUC siempre y cuando se exprese VHL. Células COS-7 y RCC-786-O fueron transfectadas con 0,7 μ g del vector reportero ODD-LUC y/o 0,5 μ g de V5-RSUME y/o 0,5 μ g de Flag-VHL-GFP y 0,3 del vector reportero pRK5-Gaussia-LUC, utilizado como control de carga. 24hs post-transfección las células fueron levantadas en buffer de lisis y la actividad de la Luciferasa Firefly y Gaussia fueron medidas. Cada valor fue normalizado a la actividad de Gaussia. Cada condición fue realizada por triplicado. Los valores se muestran como promedio \pm error estándar de un experimento representativo de tres ensayos independientes. *, $p < 0,05$ comparando con células transfectadas con el vector vacío de RSUME (barra 1 en COS-7 y barra 5 en RCC-786-O). **, $p < 0,05$ comparando con células transfectadas con el vector vacío de VHL (barra3). (ANOVA, seguido de test de Scheffé).

Posteriormente se estudió el impacto de RSUME en la función de VHL a través de su capacidad de ubiquitinar a HIF-2 α . En línea con los resultados obtenidos para la estabilidad de HIF-2 α , en las células RCC-786-O se detectaron bajos niveles de HIF-2 α ubiquitinado que no fueron modulados por RSUME (Figura 24, calle 6 vs. 5). La expresión ectópica de VHL produjo un aumento en la ubiquitinación de HIF-2 α (Figura 24, calle 7 vs 5) que fue inhibida por la sobre-expresión de RSUME (Figura 24, calle 8 vs. 7).

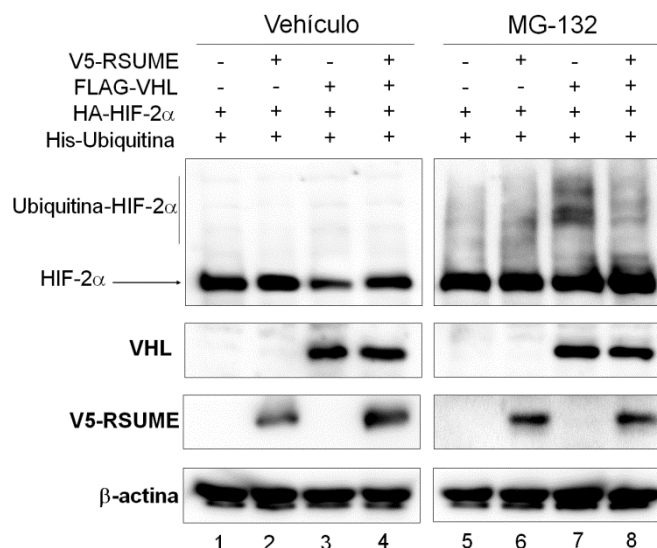


Figura 24: RSUME inhibe la ubiquitinación de HIF-2 α mediada por VHL. Células RCC-786-O fueron transfectadas con 0,5 μ g de HA-HIF-2 α , 0,5 μ g de His-Ubiquitina y/o 0,5 μ g de Flag-VHL-GFP y/o μ g de V5-RSUME. 48hs post-transfección las células fueron incubadas con el inhibidor del proteasoma MG-132 (5 μ M) o vehículo (Etanol absoluto) durante 6hs. Luego los extractos celulares fueron cosechados en Laemmli Buffer y sometidos a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

Los resultados presentados hasta este punto verifican que en normoxia, RSUME estabiliza a las subunidades HIFs- α inhibiendo la función E3 ligasa de ubiquitina de VHL. Además de HIF-1 y 2 α , VHL reconoce y ubiquitina a otras proteínas (Tarade y Ohh, 2018; Zhang y Yang, 2012). Estudiar el impacto de RSUME sobre alguno de estos blancos de degradación resultó de utilidad para reafirmar que RSUME impacta directamente en la función de VHL, ya que se esperaría que en presencia de RSUME se genere un incremento en su estabilidad de modo similar al observado para las variantes de HIFs- α .

En particular, se estudió la estabilidad de dos blancos de VHL (Jung et al., 2012; Zhang et al., 2014): el receptor de estrógenos alfa (ER α) y el co-regulador de la transcripción MYBBP1A o p-160. Células COS-7 fueron transfectadas con los vectores correspondientes para cada una de las proteínas y/o Flag-VHL-GFP y/o V5-RSUME. Tal como fue reportado (Jung et al., 2012; Zhang et al., 2014), la sobre-expresión de VHL lleva a una disminución en la estabilidad de ER α y p-160 (Figura 25 A y B). Apoyando la hipótesis planteada, cantidades crecientes de RSUME revirtieron la degradación dependiente de VHL de ER- α (Figura 25A) y de p-160 (Figura 25B).

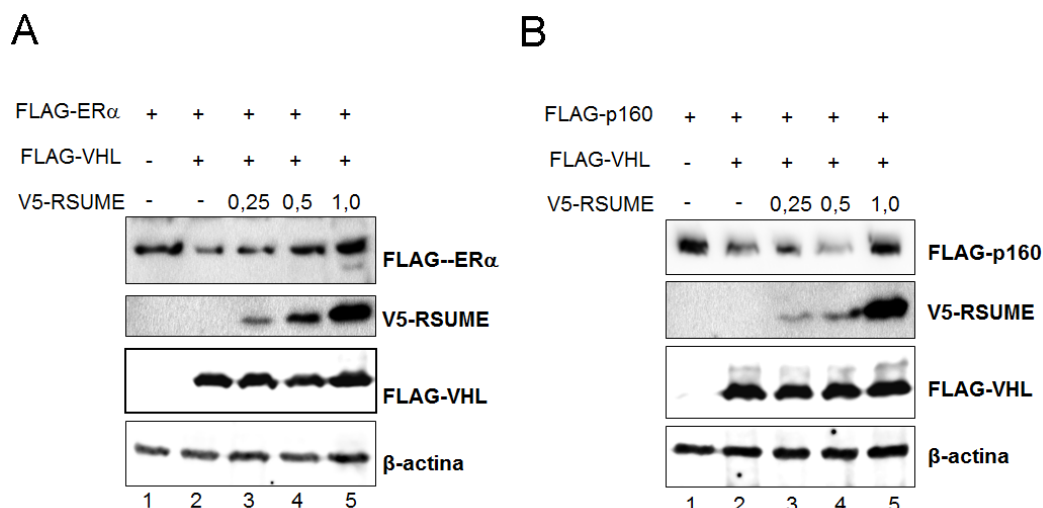


Figura 25: En presencia de VHL, RSUME estabiliza a sus blancos de ubiquitinación ER- α y p-160. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de ER- α (A) o 0,5 μ g de p-160 (B) y/o Flag-VHL-GFP y/o cantidades crecientes (0,25 μ g, 0,5 μ g o 1,0 μ g) de RSUME. 48hs. post-transfección, las células fueron cosechadas en Laemmli Buffer y sometidas a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de dos ensayos independientes con resultado similar.

Los resultados en los que verificamos que RSUME inhibe la actividad E3 ligasa de Ubiquitina de VHL, promoviendo la estabilización de HIFs- α , ER- α y p-160, dan sustento a que en normoxia RSUME impacta directamente sobre la función de VHL. En las secciones siguientes, se profundizará en los mecanismos por los cuales RSUME ejerce esta acción inhibitoria sobre la actividad de VHL.

1.2 RSUME interacciona físicamente con VHL e impacta en la unión VHL-HIF

Previamente en nuestro laboratorio se demostró por inmunoprecipitación que RSUME y VHL co-precipitan, indicando una interacción entre estas proteínas. En este sentido, surgió el interrogante de si la unión VHL-RSUME es directa o requiere algún intermediario, como podría ser HIF- α . Para responder a esto, se analizó la interacción mediante un ensayo de *pull down in vitro*. Se obtuvieron las proteínas recombinantes His-RSUME, GST-VHL y GST, y se incubaron GST-VHL y GST junto con His-RSUME. Cuando se purificaron GST-VHL y GST (control) se determinó que His-RSUME co-precipita con VHL, demostrando la interacción RSUME-VHL es directa (Figura 26).

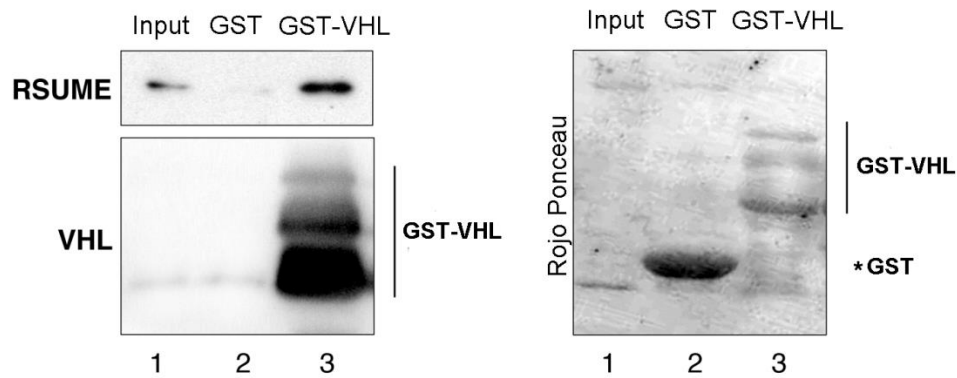


Figura 26: RSUME y VHL interactúan directamente. 7,5 μ g de RSUME recombinante fueron co-precipitados con 2,5 μ g de GST-VHL o GST recombinantes. Las fracciones fueron sometidas a SDS-PAGE seguido de WB con anticuerpos contra RSUME y VHL (panel izquierdo). Para detectar la unión inespecífica, se precipitó GST solo. Se muestra la membrana teñida con rojo de Ponceau, en la que se observa que hay purificación de GST y GST-VHL (panel derecho). Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes con resultados similares.

Demostrada la formación del heterodímero RSUME-VHL, comenzamos a estudiar sus posibles consecuencias funcionales. En este sentido nos preguntamos si el mecanismo de RSUME sobre la función de VHL ocurre a través de interferir en la unión VHL- HIF-1 o 2 α .

Se plantearon dos escenarios posibles: RSUME podría competir con las subunidades de HIF- α por el sitio de unión a VHL o unirse a VHL por otro sitio generando un cambio conformacional que lleve al desplazamiento de HIF de la unión con VHL. Si RSUME y HIFs- α se unen por el mismo sitio a VHL, se esperaría que las especies RSUME/VHL y HIF- α /VHL sean excluyentes, de modo contrario, si la unión de RSUME a VHL lleva a un posterior desplazamiento de la unión HIF- α /VHL, sería posible hallar un complejo conformado por las tres proteínas HIF- α /RSUME/VHL. Para ello, se realizó una inmunoprecipitación en tándem en células COS-7 que expresaban Flag-VHL-GFP, V5-RSUME y HA-HIF-1 α . Primero se purificó VHL y las proteínas asociadas, en una primera ronda de inmunoprecipitación. Posteriormente se eluyó VHL de las bolitas utilizadas para la primer inmunoprecipitación y se recuperó el sobrenadante, que fue sometido a una segunda ronda de inmunoprecipitación con un anticuerpo contra la etiqueta V5 de RSUME. En el extracto obtenido, se detectaron VHL, RSUME y HIF-1 α (Figura 27, calle 4), indicando que las tres proteínas forman un heterotrímero. Este resultado indicaría que las subunidades de HIF- α y RSUME se unen por sitios distintos a VHL.

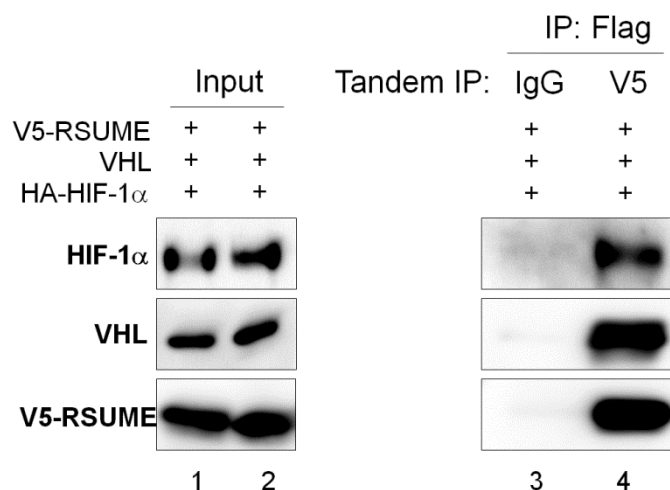


Figura 27: RSUME, HIF- α y VHL forman un complejo. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de HA-HIF-1 α , 0,5 μ g de Flag-VHL-GFP y 0,5 μ g de V5-RSUME. 48hs post-transfección las células se incubaron en 2% de suero 5 μ MG-132 durante 6 horas. Las células se lisaron y se realizó una primera inmunoprecipitación (IP) usando anticuerpos anti-Flag. Se eluyeron las fracciones inmunoprecipitadas con péptido Flag soluble y se realizó una segunda IP con anticuerpos anti-V5. Las fracciones inmunoprecipitadas de la segunda IP (Tándem IP) y las alícuotas de lisado (Input) se sometieron a SDS-PAGE y WB usando los anticuerpos HA, Flag y V5. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes con resultados similares.

El paso siguiente para comprender el mecanismo de acción de RSUME, fue analizar si efectivamente compromete la unión VHL-HIF- α . En primera instancia se utilizaron células COS-7 transfectadas con los vectores de expresión para VHL, HIF-1 α y cantidades crecientes de RSUME y se analizó por inmunoprecipitación la interacción VHL-HIF-1 α . Se verificó un desplazamiento de la unión VHL-HIF dependiente de la cantidad de RSUME presente (Figura 28, calles 7-10 vs calle 6). Esto fue acompañado por un aumento de los niveles de HIF-1 α en la fracción correspondiente al *Input* (Figura 28, calles 2-5 vs calle 1).

En las células RCC-786-O transfectadas con VHL, HIF-2 α y una dosis intermedia de RSUME (0,5 μ g) se observó también una inhibición en la unión a VHL-HIF-2 α (Figura 29, calle 4 vs calle 3), acompañado de una estabilización de HIF-2 α en la fracción correspondiente al *Input* (Figura 29, calle 2 vs calle1).

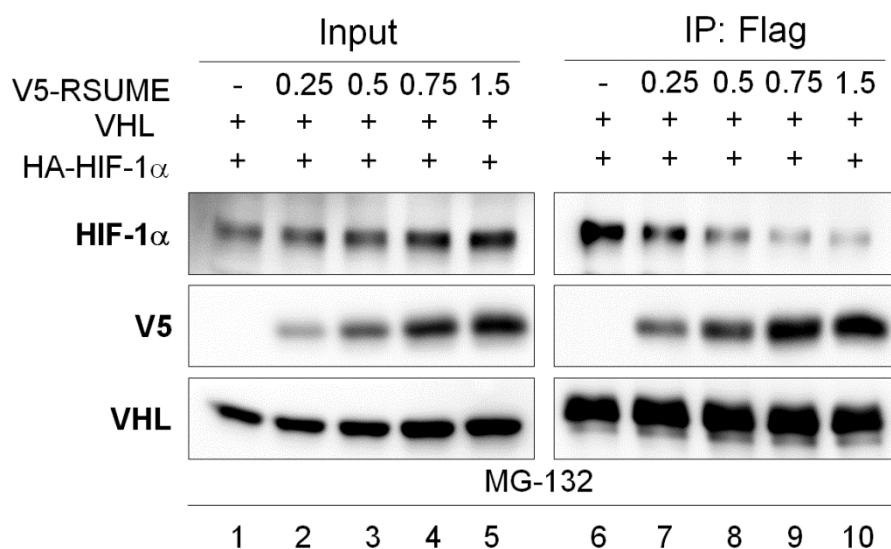


Figura 28: RSUME afecta la interacción VHL/HIF-1 α . Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de plásmido para HA-HIF-1 α , 0,5 de Flag-VHL-GFP y/o cantidades crecientes de V5-RSUME (0,25, 0,5, 0,75 y 1.5 μ g). 48hs post-transfección las células fueron incubadas por 6hs con el inhibidor de proteasoma MG-132 (5 μ M) en medio 2% suero. Las células fueron lisadas en Buffer RIPA y se desarrolló el protocolo para la inmunoprecipitación de VHL, utilizando el anticuerpo específico contra Flag. De cada condición ensayada se obtuvo un extracto crudo (Input) y una fracción correspondiente a la inmunoprecipitación. Ambos fueron sometidos a una electroforesis en SDS-PAGE y WB con el anticuerpo indicado. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

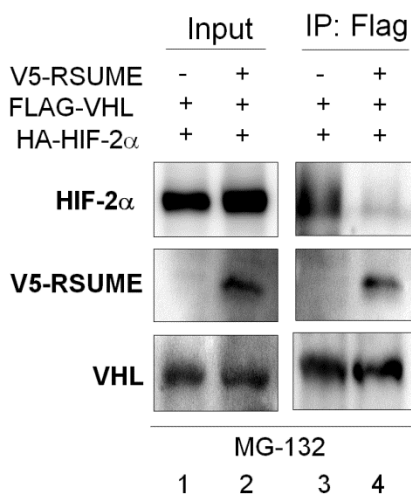


Figura 29: RSUME afecta la interacción VHL/HIF-2 α en el contexto celular de la enfermedad VHL. Células RCC-786-O fueron transfectadas con 0,5 μ g de plásmido para HA-HIF-12, 0,5 de Flag-VHL-GFP y/o V5-RSUME 0,5 μ g o sus plásmido control. 48hs post-transfección las células fueron incubadas por 6hs con el inhibidor de proteasoma MG-132 (5 μ M) en medio 2% suero. Las células fueron lisadas en Buffer RIPA y se desarrolló el protocolo para la inmunoprecipitación de VHL, utilizando el anticuerpo específico contra Flag. De cada condición ensayada se obtuvo un extracto crudo (Input) y una fracción correspondiente a la inmunoprecipitación. Ambos fueron sometidos a una electroforesis en SDS-PAGE y WB con el anticuerpo indicado. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

I.3 **RSUME promueve un aumento en la sumoilación de VHL**

Considerando que RSUME ha sido descrito como un *enhancer* de la vía de sumoilación (Carbia-Nagashima et al., 2007), y que VHL es blanco de esta modificación (Cai y Robertson, 2010), el siguiente paso fue estudiar la contribución de RSUME a los niveles de sumoilación de VHL. A fines de responder esta pregunta, en primera instancia se procedió a realizar un ensayo de sumoilación *in vitro* utilizando las proteínas recombinantes rhRSUME, GST-VHL y GST-VHL_{K171R} (mutante de VHL en el sitio principal de sumoilación), SUMO-1 y las enzimas de la maquinaria de sumoilación (E1 y Ubc9). En ausencia de alguno de los componentes (E1, GST-VHL o SUMO-1) no se detectaron bandas correspondiente a VHL sumoilado (Figura 30, calles 1-3). De hecho, en presencia de los sustratos y enzimas necesarios, sí se detecta VHL sumoilado, que incluso incrementó cuando a la mezcla de reacción se le agregó rhRSUME (Figura 30, calle 5 vs calle 4), confirmando que RSUME actúa como un modulador positivo de esta modificación sobre VHL. Adicionalmente se corroboró la identidad de SUMO-VHL al ver que la variante VHL_{K171R} no presenta la banda correspondiente a SUMO conjugado a VHL (Figura 30, calles 6 y 7).

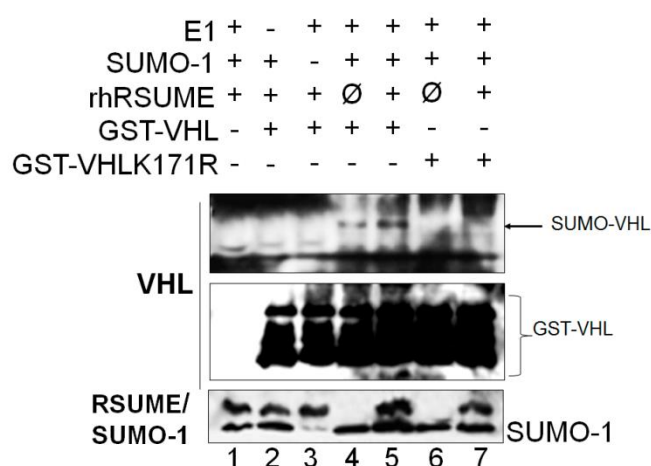


Figura 30: RSUME incrementa los niveles de VHL sumoilado *in vitro*. Conjugación *in vitro* de SUMO-1 a las proteínas recombinantes GST-VHL y GST-VHLK171R, en presencia o ausencia de 0,5 μ g de la proteína humana RSUME recombinante (rhRSUME). Las mezclas de reacción fueron sometidas a SDS-PAGE seguido de WB utilizando los anticuerpos contra RSUME, SUMO-1 y VHL. Se muestra un experimento representativo de dos ensayos independientes. ∅: Control correspondiente a extracto de proteínas purificadas de *E.coli* transformadas con el vector de expresión en el cual fue subclonado rhRSUME (vector pQE30).

A partir de que encontramos que RSUME aumenta la conjugación de SUMO a VHL en condiciones *in vitro*, nos propusimos verificar esta acción en el contexto de la célula. Para ello se utilizaron dos aproximaciones experimentales, por un lado se analizaron por WB contra VHL extractos de células transfectadas y por otro, se realizó una

cromatografía de afinidad para purificar proteínas sumoiladas en condiciones desnaturalizantes.

Para el primer caso, células COS-7 fueron transfectadas con Flag-VHL junto con las variantes HA-SUMO-1 o SUMO-2, V5-Ubc-9 y/o RSUME y/o la E3 ligasa de SUMO descrita para VHL, PIAS- γ . VHL resultó blanco de sumoilación tanto de SUMO-1 como de SUMO-2 (Figura 31) y a su vez, la sobre-expresión de RSUME llevó a un aumento de los niveles de VHL-SUMO-1 y VHL-SUMO-2 (Figura 31, calle 2 vs calle 1 y calle 6 vs calle 5), dando sustento a los resultados obtenidos en la sumoilación *in vitro* (Figura 30). Dado que la co-expresión de RSUME y PIAS- γ no incrementó aún más la sumoilación de VHL, podría ser que estas proteínas actúen en principio por las mismas vías (Figura 31, calle 4vs calle 3 y calle 8 vs calle 7).

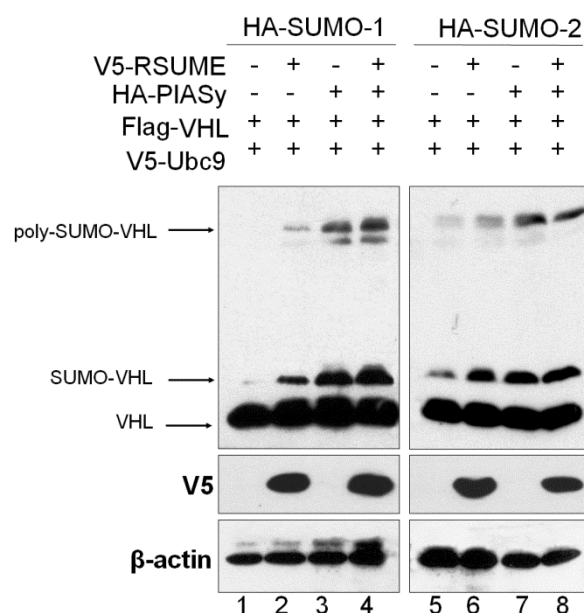


Figura 31: RSUME aumenta la sumoilación de VHL en células. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de Flag-VHL, 0,3 μ g de V5-Ubc9, 0,3 μ g de HA-SUMO-1 o HA-SUMO-2 y/o 0,5 μ g de V5-RSUME o su plásmido control y/o 0,5 μ g de HA-PIAS γ o su plásmido control. 48hs. post-transfección, las células fueron cosechadas en Laemmli Buffer y sometidas a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

Luego se evaluaron los efectos de RSUME realizando un ensayo de purificación de proteínas sumoiladas utilizando una cromatografía de afinidad entre una resina de Niquel (NiNta) y una cola de seis histidinas asociadas a SUMO (6x-His-SUMO). Células COS-7 fueron transfectadas con el plásmido 6xHis-SUMO-2 y/o V5-Ubc9 y/o PIAS- γ , Flag-VHL y/o V5-RSUME (Figura 32A) o un siRNA específico contra RSUME (siRSUME) para silenciar el RSUME endógeno de las células COS-7 (Figura 32B). La sobre-expresión de RSUME llevó a un incremento en los niveles de VHL-SUMO-2

(Figura 32A, calle 9 vs calle 8). La co-expresión de RSUME con PIAS- γ no mostró mayores niveles de VHL sumoilado que solo con PIAS- γ (Figura 32A, calle 11 vs calle 10). El efecto de RSUME en la sumoilación de VHL fue más notorio cuando este fue silenciado, evidenciado por en una clara disminución de VHL-SUMO-2 (Figura 32B, calle 7 vs calle 6). Se utilizó la mutante de sumoilación de VHL_{K171R} para realizar la cromatografía, confirmando la identidad de las bandas correspondientes a VHL sumoilado (Figura 32B, calle 8).

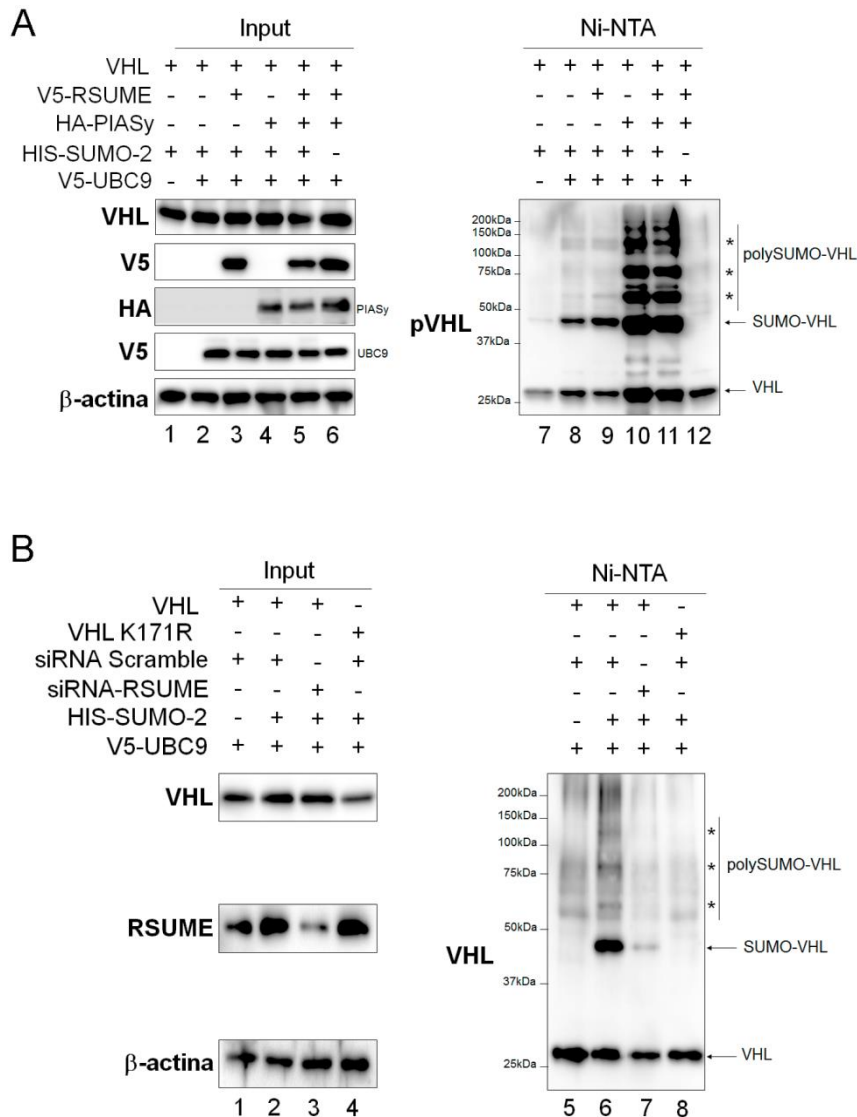


Figura 32: RSUME modula positivamente la sumoilación de VHL. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,6 μ g de Flag-VHL, y/o 0,6 μ g de 6xHis-SUMO-2, y/o 0,1 μ g de V5-Ubc9, y/o 0,05 μ g de V5-RSUME o su plásmido control (A) o siRNA contra RSUME (20 μ M) como control (B) y/o 0,1 μ g de HA-PIASy o su plásmido control (A). A las 48 hs de la transfección las células fueron cosechadas, una alícuota fue tomada como Input y el resto de los extractos fueron utilizados para una cromatografía de afinidad con una resina de Ni²⁺ para purificar 6xHis-SUMO-2 (Ni-NTA). Las fracciones purificadas y los Input fueron sometidos a SDS-PAGE y posterior WB utilizando anti V5, HA, VHL y β -actina. Se muestra un ensayo representativo de dos ensayos independientes son resultado similar.

De estos abordajes experimentales se concluye que RSUME modula positivamente la sumoilación de VHL. La pregunta que se desprendió de estos resultados es si los efectos observados por RSUME sobre la funcionalidad de VHL (estabilidad de HIF, unión a HIF) están vinculados a la acción de RSUME sobre la sumoilación de VHL.

1.4 **RSUME actúa sobre HIF independientemente de su acción sobre la sumoilación de VHL**

Para responder el interrogante planteado se evaluó si RSUME es capaz de incrementar los niveles de HIF- α al expresar la variante de VHL con sumoilación deficiente (VHL_{K171R}). En células COS-7 que sobre-expresando VHL_{WT} o VHL_{K171R} la sobreexpresión de RSUME se vio acompañada de un aumento en los niveles de HIF-1 α (Figura 33A, calle 2 vs calle 1 y calle 4 vs calle 3) y de HIF-2 α (Figura 33B, calle 2 vs calle 1 y calle 4 vs calle 3), indicando que RSUME tendría efectos que son independientes del estado de sumoilación de VHL.

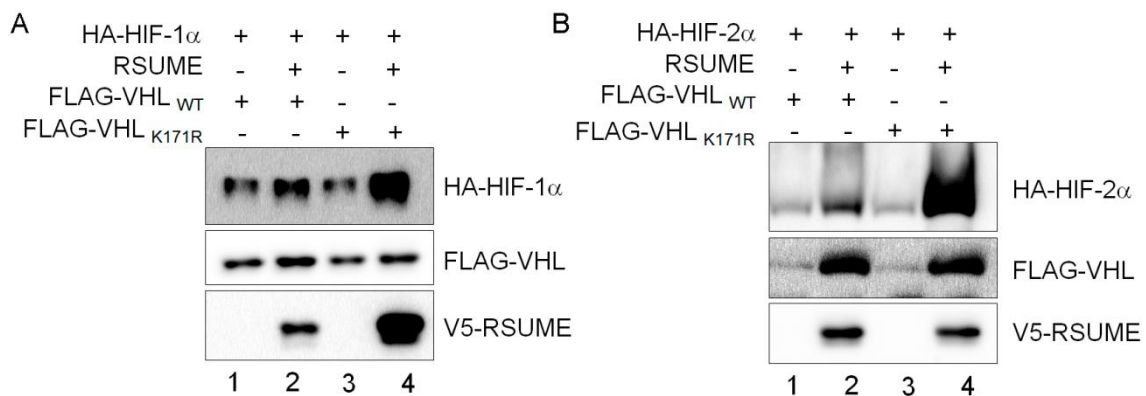


Figura 33: RSUME aumenta la estabilidad de HIF- α frente a una variante deficiente en sumoilación de VHL. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de HA-HIF-1 α (A) o HA-HIF-2 α (B) y/o 0,5 μ g de V5-RSUME y/o 0,5 μ g Flag-VHL-GFP o Flag-VHL_{K171R}-GFP. 48hs post-transfección las células fueron cosechadas en Laemmli Buffer y sometidas a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-1 α (A) o HIF-2 α (B), Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

De igual modo a lo realizado para VHL_{WT} (Figura 21), se ensayó una curva de tiempo en normoxia para ver la capacidad de la variante VHL_{K171R} de mediar la degradación de HIF-2 α y de qué modo RSUME afecta esta función. Analizando la degradación de HIF por VHL_{K171R} (Figura 34, calles 1-4), observamos que RSUME bloqueó su función (Figura 34, calles 5-8 vs calles 1-4). Estos resultados muestran que en presencia de la variante de VHL deficiente en sumoilación, RSUME mantiene sus efectos respecto a la estabilización de HIF- α .

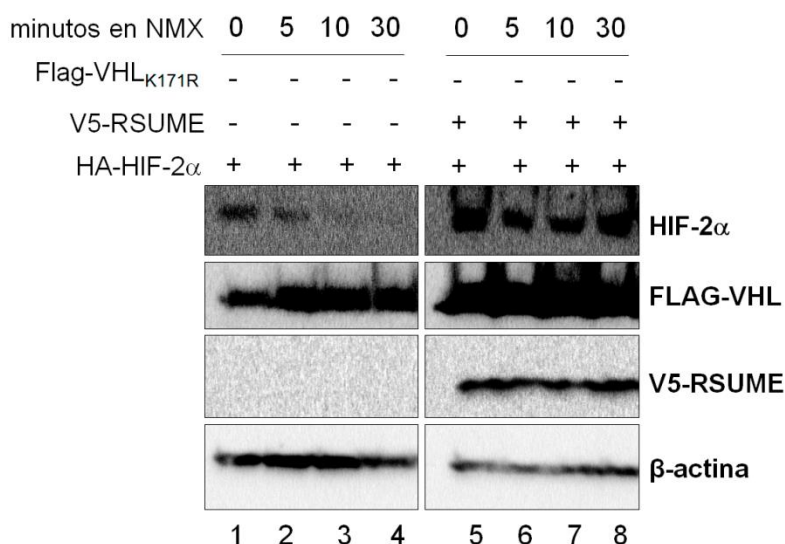


Figura 34: RSUME bloquea la degradación de HIF-2 α mediada por VHL_{K171R}. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,2 μ g de HA-HIF-2 y/o 0,5 μ g de V5-RSUME y/o 0,5 μ g Flag-VHL_{K171R}-GFP. 48hs post-transfección las células fueron sometidas a 4hs de HPX (1% de O₂) y los extractos celulares fueron cosechados en Laemmli Buffer a diferentes tiempos de NMX (21% O₂) (0, 5, 10 y 30 minutos). Los extractos fueron sometidos a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

Como complemento a la estrategia utilizada, una forma de determinar si los efectos de RSUME sobre VHL son independientes de su rol como modulador positivo de la sumoilación, es inhibir la sumoilación a nivel general. Esto se realizó mediante la transfección del plásmido que codifica para la proteína viral Gam-1 (Chiocca, 2007; Pozzebon et al., 2009). Sobre estas células, se evaluó si RSUME mantiene la capacidad de incrementar a HIF- α . En línea con los resultados obtenidos para la mutante de VHL_{K171R} (Figura 33 y Figura 34), a pesar de esta inhibición sobre la sumoilación, RSUME incrementó los niveles de HIF-2 α , revirtiendo la acción de VHL endógeno y del sobre-expresado (Figura 35, calle 2 vs calle 1 y calle 4 vs calle 3). Como control de que los efectos observados no están dados por la expresión de la proteína GAM-1, las células fueron transfectadas con una mutante que no afecta la cascada de sumoilación, condición en la que RSUME mantuvo también la capacidad de incrementar los niveles de HIF-2 α (Figura 35 calle 6 vs calle 5 y calle 8 vs calle 7).

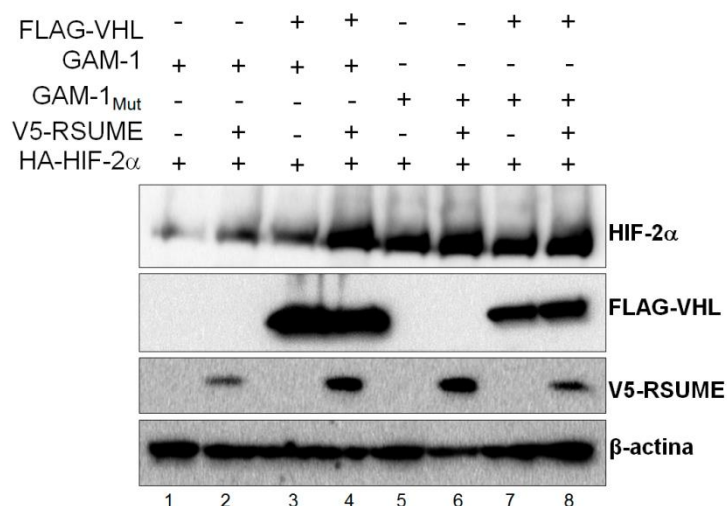


Figura 35: RSUME bloquea la degradación de HIF-2 α mediada por VHL en incluso al inhibir la sumoilación a nivel general. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,2 μ g de HA-HIF-2 y/o 0,5 μ g de V5-RSUME y/o 0,5 μ g Flag-VHL-GFP y/o 0,3 μ g de Gam-1 o Gam-1 mutante (control). 48hs post-transfección las células fueron sometidas cosechadas en Laemmli Buffer. Los extractos fueron sometidos a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

Tal como se ha mencionado previamente, la estabilización de HIF- α está asociada a un aumento en la actividad transcripcional de HIF y con ello en la expresión de genes que contienen elementos de respuesta a HIF en su promotor (HRE).

Teniendo en cuenta que en última instancia la actividad desregulada de HIF es lo que genera un ambiente propicio para la formación y supervivencia tumoral, resultó de relevancia analizar el efecto de RSUME sobre la función de VHL_{WT} y VHL_{K171R} a través de la actividad transcripcional de HIF-2. Para ello, las células COS-7 fueron transfectadas el reportero de actividad transcripcional de HIF, HRE-LUC. La sobre-expresión de RSUME incrementó la actividad de HIF, revirtiendo tanto los efectos de VHL endógeno como del transfectado (Figura 36, barra 2 vs barra1 y barra 4 vs barra 3). En cuanto a los efectos de RSUME dependientes de la sumoilación de VHL, en línea con los resultados obtenidos (Figuras 33-35), RSUME aumentó la actividad de HIF-2, revirtiendo los efectos inhibitorios de VHL_{K171R} (Figura 36, barra 6 vs barra 5).

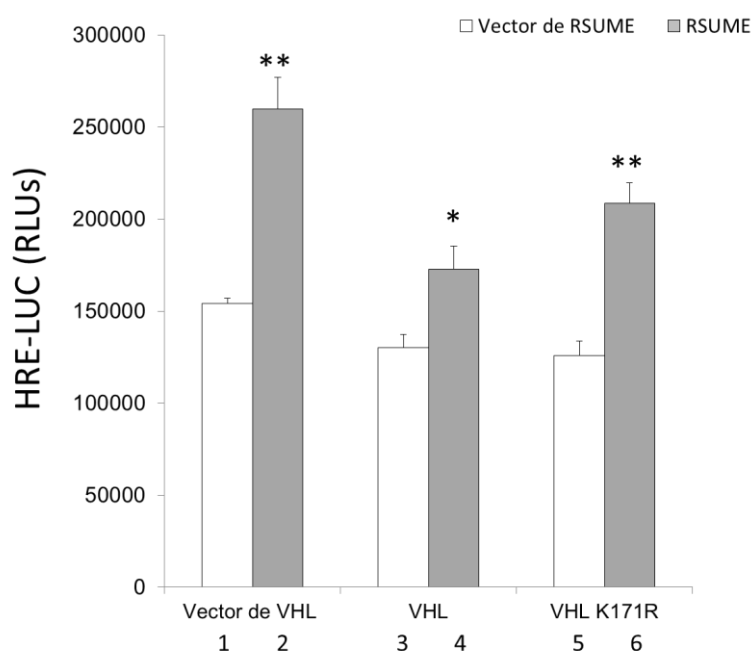


Figura 36: RSUME aumenta la actividad transcripcional de HIF en presencia de VHL_{K171R}. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de Flag-VHL-GFP o Flag-VHL_{K171R}-GFP o su vector control y/o 0,7 μ g de V5-RSUME o su vector control, 0,2 μ g de HA-HIF-2 α , 0,5 μ g del reportero de actividad de HIF, HRE-LUC y 0,3 μ g del reportero CMV- β -galactosidasa como control de carga. 24hs post-transfección las células fueron levantadas en buffer de lisis y la actividad de la Luciferasa Firefly fue medida. Cada valor fue normalizado a la actividad de la β -galactosidasa. Cada condición fue realizada por triplicado. Los valores se muestran como promedio \pm error estándar de un experimento representativo de tres ensayos independientes. *, $p < 0,05$ y **, $p < 0,01$ comparando con la respectiva condición transfectada con el vector vacío de RSUME. (ANOVA, seguido de test de Scheffé).

A fines de estudiar la regulación de la estabilidad y actividad transcripcional de HIF en un contexto celular del síndrome de VHL, analizamos los efectos de RSUME sobre la función de la variante VHL_{K171R} en las células RCC-786-O. En células transfectadas con cada variante de VHL (WT o K171R) se observó, al igual que las células COS-7 (Figura 34), que la sobre-expresión de RSUME revierte la acción de VHL_{WT} y VHL_{K171R} (Figura 37, calle 2 vs calle 1 y calle 4 vs calle 3, respectivamente), reafirmando nuestros hallazgos sobre la acción de RSUME independiente de su rol como modulador positivos de la sumoilación.

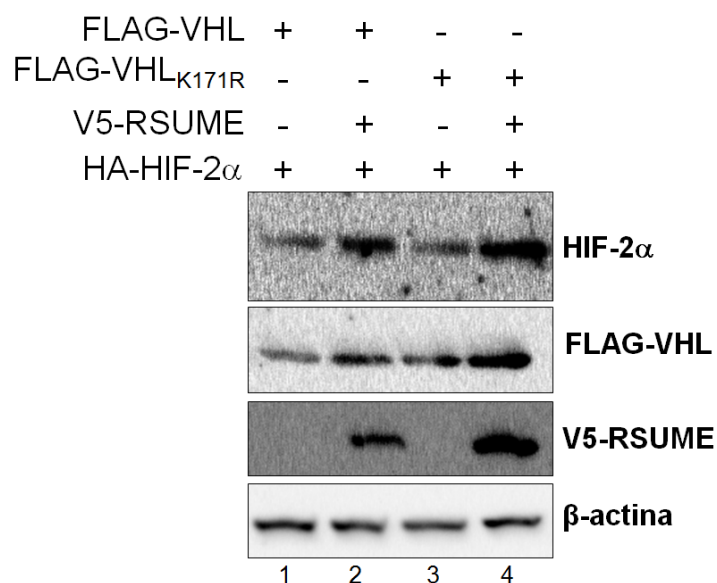


Figura 37: RSUME aumenta la estabilidad de HIF-2 α frente a una variante deficiente en sumoilación de VHL en el modelo de celular de la enfermedad VHL. Células RCC-786-O fueron transfectadas con 0,5 μ g de HA-HIF-2 y/o 0,5 μ g de V5-RSUME y/o 0,5 μ g Flag-VHL-GFP o Flag-VHL_{K171R}-GFP. 48hs post-transfección las células fueron cosechadas en Laemmli Buffer y sometidas a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

Utilizando el mismo sistema celular, se analizó la acción de RSUME sobre un gen endógeno controlado por HIF-2, VEGF. Se midieron los niveles de expresión de VEGF a través de PCR en tiempo real, observando que la co-expresión de VHL_{WT} o VHL_{K171R} junto con RSUME trae aparejado un incremento de los niveles de ARN mensajero de VEGF (Figura 38 barra 2 vs barra 1 y barra 4 vs barra 3, respectivamente). Este resultado acompaña lo demostrado para el reportero de actividad transcripcional de HIF e indica que RSUME, a través de inhibir la función de VHL e incrementar la estabilidad de HIF, produce un aumento de la expresión de genes que llevan a la adaptación a hipoxia celular.

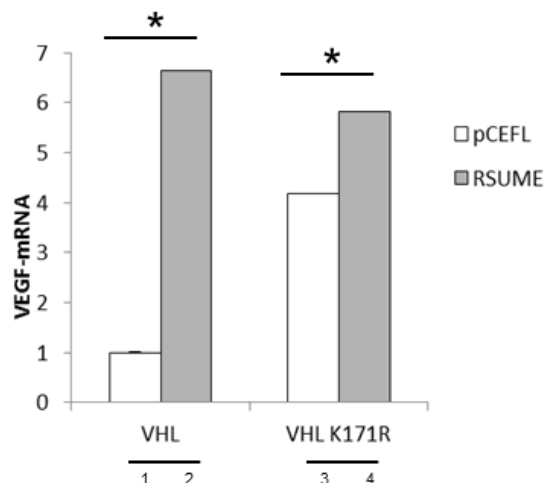


Figura 38: RSUME revierte la acción de VHL_{WT} y VHL_{K171R} incrementa la expresión del blanco de HIF, VEGF-A. Células RCC-786-O fueron transfectadas con 1,0 µg Flag-VHLWT-GFP o Flag-VHLK171R-GFP y/o 1,5 µg V5-RSUME. 48 hs post-transfección las células se cosecharon y se purificó el ARNm. Los niveles de expresión de ARNm de VEGF-A fueron determinados por qRT-PCR. Los valores se muestran como el promedio de triplicados ± SEM, luego de normalizar por los valores de expresión del control de carga RPL19. *, p<0.05 cuando se comparó para cada variante de VHL con la condición transfectada con RSUME contra su vector vacío pCEFL (ANOVA con test de Scheffé).

Establecimos que RSUME inhibe la función de VHL independientemente de su estado de sumoilación. La siguiente pregunta que nos realizamos fue si los mecanismos que hemos descrito para la variante de VHL_{WT} se mantienen para la variante deficiente en sumoilación de VHL o en condiciones en las que la sumoilación de encuentra inhibida (Gam-1).

En este sentido, se analizó la interacción VHL-RSUME y sus consecuencias en la unión VHL-HIF- α . Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en ambas condiciones experimentales. En primer instancia, al observar los extractos correspondientes a los *Inputs* se reafirmaron los resultados obtenidos previamente, mostrando que RSUME incrementa los niveles de HIF-2 α en presencia de VHL_{K171R} o al inhibir la sumoilación con Gam-1 (Figura 39A, calle 4vs calle 3 y Figura 39B calle 2 vs calle 1). Al analizar la fracción correspondiente a la inmunoprecipitación, se demostró que RSUME interacciona con VHL independientemente de su sumoilación (Figura 20A, calles 6 y 8 y Figura 20B, calles 6 y 8) y que RSUME promueve una disminución de la interacción VHL-HIF-2 α (Figura 20A, calle 8 vs calle 7 y Figura 20B, calle 6 vs calle 5).

Estos hallazgos confirman que el mecanismo descrito para RSUME sobre la función de la proteína VHL es independiente de la sumoilación e involucra la disminución de la interacción VHL-HIF.

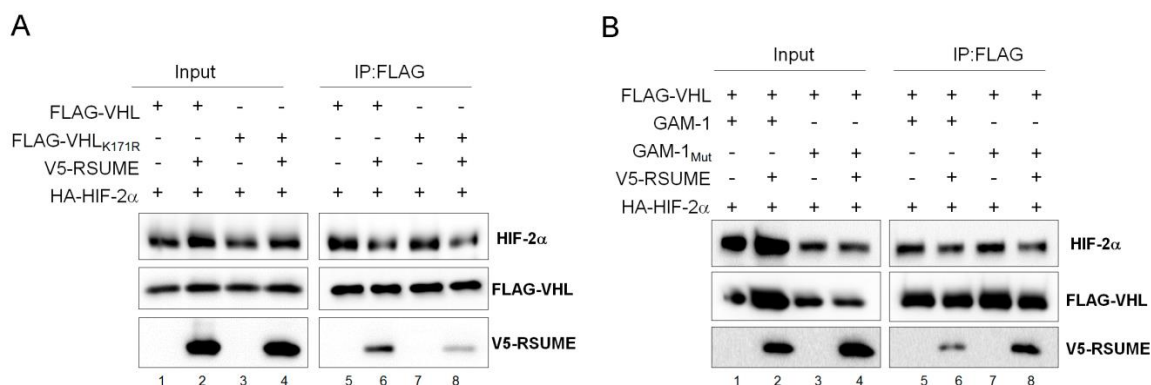


Figura 39: RSUME afecta la unión VHL-HIF- α independientemente del estado de sumoilación de VHL. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de HA-HIF-2 α , 0,5 μ g de Flag-VHL_{WT}-GFP o Flag-VHL_{K171R}-GFP (A) o 0,5 μ g de Flag-VHL_{WT}-GFP (B) y/o 0,5 μ g de V5-RSUME y 0,3 μ g de Gam-1 o Gam-1 mutante (B). 48hs post-transfección las células fueron incubadas por 6hs con el inhibidor de proteasoma MG-132 (5 μ M) en medio 2% suero. Las células fueron lisadas en Buffer RIPA y se desarrolló el protocolo para la inmunoprecipitación de VHL, utilizando el anticuerpo específico contra Flag. De cada condición ensayada se obtuvo un extracto crudo (Input) y una fracción correspondiente a la inmunoprecipitación. Ambos fueron sometidos a una electroforesis en SDS-PAGE y WB con el anticuerpo indicado. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

II. Capítulo II: RSUME en el contexto de la enfermedad VHL y su impacto en la función de las mutantes de VHL

Como fue descrito en la introducción (Figura 9) la expresión de RSUME es elevada en tejidos que son sensibles a la formación de tumores en el síndrome VHL (Carbia-Nagashima et al., 2007) y se expresa en tumores del tipo VHL. Además, como fue descrito en la Introducción, RSUME se encuentra elevado en tumores RCC, con una disminución en la supervivencia de los pacientes (Figura 18). Hemos demostrado que RSUME modula negativamente la función de VHL elevando la estabilidad de HIF y con ello a una actividad desregulada de HIF en normoxia, generando un escenario pseudohipóxico tal como el observado en la enfermedad de VHL.

Por todo esto, RSUME surge como un factor de interés a la hora de estudiar el desarrollo de la enfermedad VHL, por lo que nos propusimos estudiar de qué modo RSUME impacta en la funcionalidad de diferentes mutantes de VHL características del síndrome.

II.1 RSUME se expresa en tumores VHL

Hasta el momento en el laboratorio se había descrito la expresión de RSUME en muestras de tumores de pacientes VHL (Feocromocitomas y Hemangioblastomas) a nivel de ARN mensajero (Tesis Licenciatura Lucas Tedesco, página 55 y Gerez et al., 2015). A lo largo de la presente Tesis, a partir de muestras de Feocromocitomas,

Hemangioblastoma y RCC se analizó RSUME a nivel de la proteína. Se detectó RSUME por WB en los Feocromocitomas (Figura 40A), por inmunofluorescencia en el Hemangioblastoma (Figura 40B) y por inmunohistoquímica para los RCC (Figura 40C).

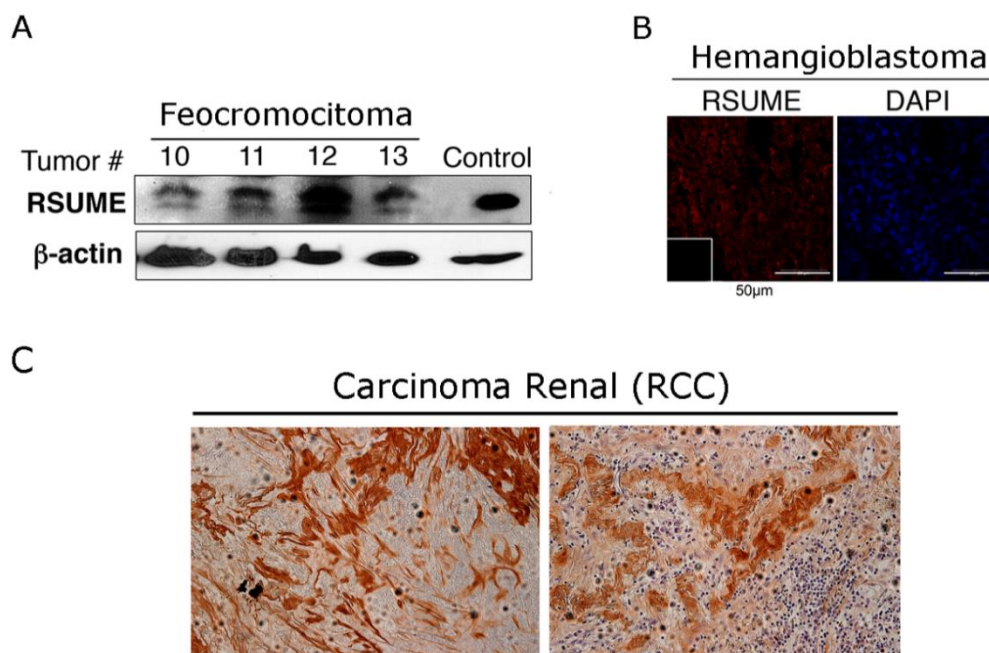


Figura 40: RSUME se expresa en tumores VHL. (A) WB realizado para detectar RSUME endógeno en explantes de Feocromocitomas humanos. β -actina fue utilizada como control de carga. Como control positivo se utilizó un extracto de células COS-7 transfectadas con V5-RSUME. (B) Inmunofluorescencia contra RSUME endógeno (rojo) en una muestra fijada de Hemangioblastoma de retina. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). El correspondiente control de anticuerpo secundario (omitiendo anticuerpo primario) se muestra en un recuadro de la esquina inferior izquierda. Se indica la escala, con la barra correspondiendo a 50 μ m. (C) Inmunohistoquímica en muestras fijada de Carcinoma Renal de Células Claras (RCC). Se visualiza la señal positiva para RSUME en marrón. A modo de contraste se tiñeron las células con hematoxilina.

Que RSUME se exprese en tumores en los que hay pérdida de la función de VHL, llevó a preguntarnos cuáles son los mecanismos que subyacen al aumento de la expresión de RSUME en esta patología. Anteriormente, utilizando un reportero de expresión de RSUME (RSUME-LUC): promotor mínimo de RSUME controlando al gen de la Luciferasa, habíamos determinado que VHL inhibe a nivel transcripcional la expresión de RSUME (Tesis Licenciatura Lucas Tedesco y Gerez et al., 2015). Dado que en la enfermedad VHL hay mutaciones de VHL que comprometen su función, es que nos propusimos indagar si dicha actividad disminuida es suficiente para establecer un escenario propicio para desregulación de RSUME.

Utilizando el reportero RSUME-LUC en células A-498-O (Derivadas de RCC, VHL^{-/-}) transfectadas con VHL_{WT} o las variantes característica del síndrome Tipo 2 (Tyr112His, Arg167Gln o Leu188Val), se observó que mientras VHL regula negativamente la

expresión de RSUME a nivel transcripcional (Figura 41, barra 2 vs barra 1), las mutantes de VHL fueron incapaces de inhibir a RSUME (Figura 41, barras 3, 4 y 5 vs barra 1 y 2).

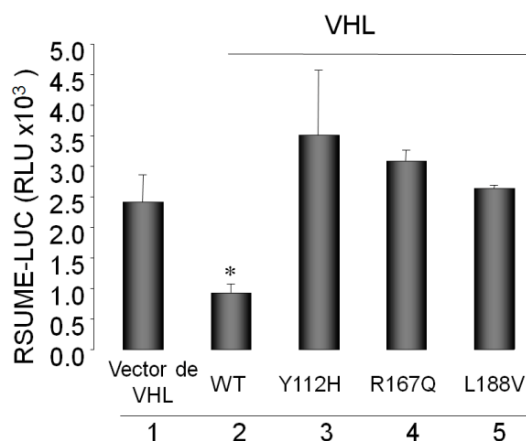


Figura 41: Las mutantes de VHL no regulan la expresión de RSUME. Células de la línea celular A-498 fueron transfectadas con 0,5 µg de las variantes indicadas de Flag-VHL, y su respectivo control (vector.) Además se transfectaron 0,7µg del reportero RSUME-LUC. Cada condición fue realizada por triplicado. 24hs luego de la transfección las células se levantaron con Buffer de Lisis y se determinó la actividad Luciferasa. Como control de la eficiencia de transfección se utilizó el reportero Gaussia. Los resultados se muestran como promedio ± error estándar del triplicado de uno de los tres experimentos independientes ensayados con resultados similares. * p<0,05; comparando con células transfectadas solo con el control (barra 1) (ANOVA, Test de Scheffé).

Adicionalmente a los ensayos de gen reportero, se analizaron los niveles proteicos de RSUME sobre células RCC-786-O transfectadas con las diferentes variantes de VHL. En concordancia con lo observado para el ensayo reportero de RSUME-LUC (Figura 41), mientras que VHL inhibió la expresión de RSUME endógeno (Figura 42), las mutantes de VHL de Tipo 2 perdieron dicha función (Figura 42).

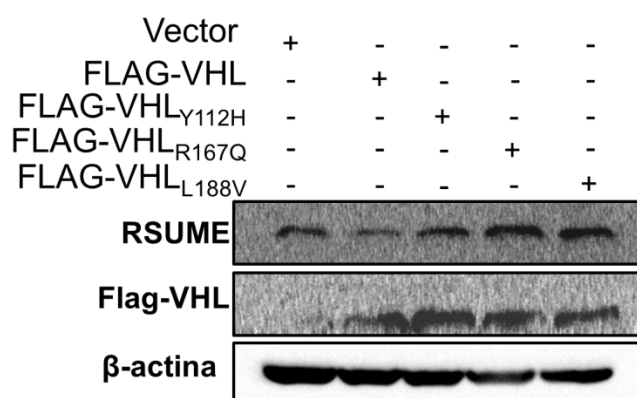


Figura 42: Las mutantes de VHL pierden la capacidad de regular la expresión de RSUME. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 µg la variantes indicadas de VHL o su vector vacío. 48hs post-transfección las células fueron sometidas a 4hs de HPX (1% de O₂) y los extractos celulares fueron cosechados en Laemmli Buffer a diferentes tiempos de NMX (21% O₂) (0, 5, y 30 minutos). Los extractos fueron sometidos a SDS-PAGE seguido de WB con los

anticuerpos contra RSUME, Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de cuatro ensayos independientes con resultado similar.

Estos resultados confirman que la deficiencia funcional de las mutantes de VHL explicaría el establecimiento del contexto patológico que lleva a un incremento a los niveles de RSUME. El hecho de que perturbaciones parciales en la función de VHL sean suficientes para que se pierda por completo la inhibición de la expresión de RSUME (Figura 42, calles 3-5 vs calle 2) muestra la importancia que toma RSUME en el establecimiento del escenario patológico de VHL.

II.2 **Acción de RSUME sobre las mutantes de VHL**

En el capítulo anterior se presentaron resultados mostrando como RSUME actúa directamente sobre VHL afectando su unión a HIF- α y con ello, impidiendo su degradación.

El hecho de que RSUME se exprese en tumores VHL, que las mutantes de VHL son incapaces de regular negativamente los niveles de RSUME y que se ha reportado que las mutantes de VHL Tipo 2 presentan una disminución parcial en su función (Clifford et al., 2001; Hacker et al., 2008; Hoffman et al., 2001; Rechsteiner et al., 2011), llevaron a que estudiemos el rol de RSUME en el establecimiento del fenotipo del síndrome VHL Tipo 2. Puntualmente nos enfocamos en determinar si RSUME afecta la función de las mutantes de VHL Tyr112His, Arg167Gln y Leu188Val, analizando tanto la estabilidad como actividad transcripcional de HIF.

En células RCC-786-O transfectadas con las diferentes mutantes de VHL (Figura 42), el incremento de los niveles de RSUME fue suficiente para que se genere un aumento en los niveles de HIF-2 α respecto a VHL_{WT} (Figura 42, calles 3-5 vs calle 2). Cuando se expresaron las diferentes variantes de VHL en células COS-7 y RCC-786-O, la sobre-expresión de RSUME resultó en un incremento de los niveles de HIF-2 α (Figura 43 y 44), indicando que RSUME potencia la pérdida de función de las mutantes de Tipo 2 de VHL. Adicionalmente, en células previamente expuestas a HPX y luego cultivadas en NMX, RSUME bloqueó la degradación de HIF-2 α producida por las diferentes mutantes de VHL (Figura 45).

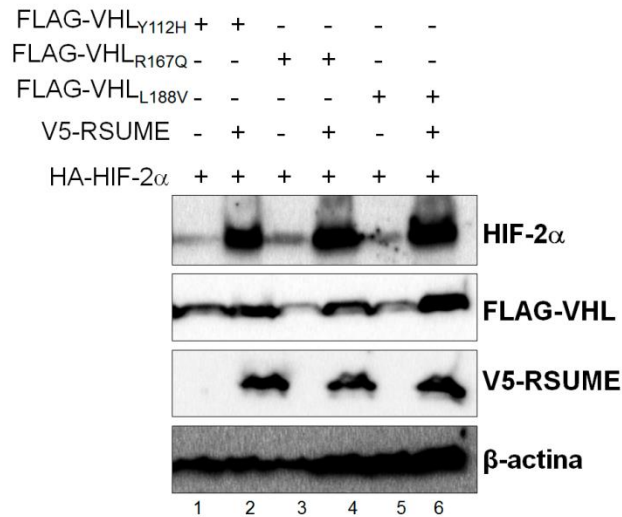


Figura 43: RSUME promueve la pérdida de función de las mutantes de VHL. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de los vectores de expresión de las variantes de VHL indicadas y/o 0,5 μ g RSUME o su vector control y 0,2 μ g de HA-HIF-2 α . 48hs post-transfección las células fueron cosechadas en Laemmli Buffer. Los extractos fueron sometidos a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

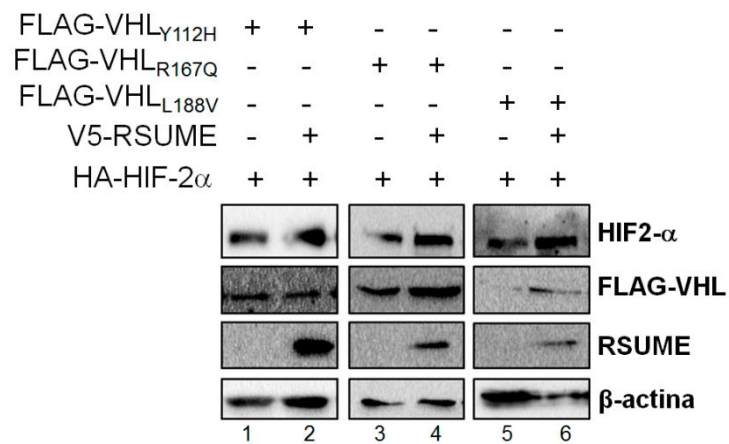


Figura 44: RSUME promueve la pérdida de función de las mutantes de VHL. Células RCC-786-O fueron transfectadas con 1.0 μ g de los vectores de expresión de las variantes de VHL indicadas y/o 1,5 μ g RSUME o su vector control y 0,2 μ g de HA-HIF-2 α . 48hs post-transfección las células fueron cosechadas en Laemmli Buffer. Los extractos fueron sometidos a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

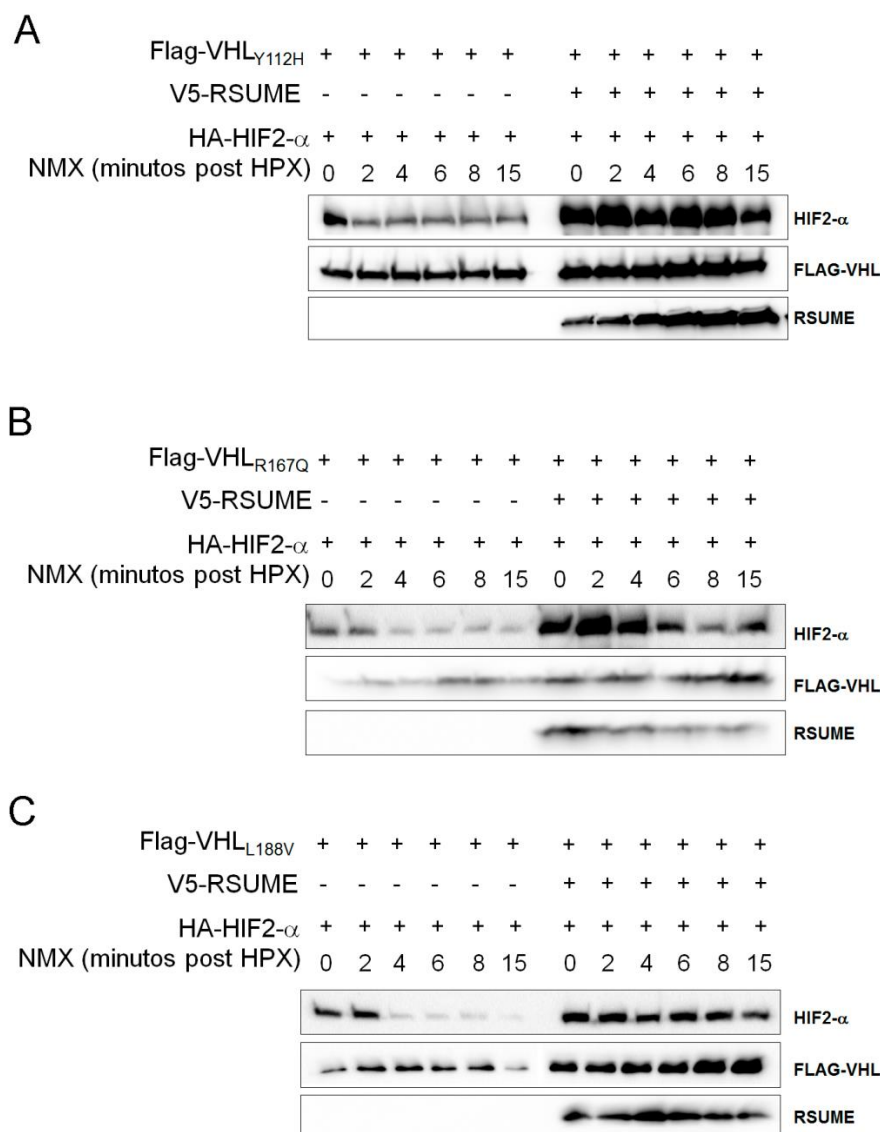


Figura 45: RSUME bloquea la acción de las mutantes de VHL con función parcial, estabilizando a HIF-2 α . Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de los vectores de expresión de las variantes de VHL indicadas y/o 0,5 μ g RSUME o su vector control y 0,1 μ g de HA-HIF-2 α . 48hs post-transfección las células fueron sometidas a 4hs de hipoxia (HPX). A los tiempos de NMX indicados los extractos fueron cosechados y sometidos a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag y V5. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

Tal como fue mencionado previamente, las mutaciones en VHL llevan a una disminución parcial en su función, promoviendo una actividad transcripcional de HIF desregulada. Dado que RSUME potencia la disminución en la función de mutantes de VHL, se analizó si los niveles de HIF- α alcanzados por RSUME incrementan la actividad transcripcional de HIF. Esto se analizó transfectando células COS-7 con las diferentes mutantes de VHL, junto con el reportero HRE-LUC. En línea con lo ya reportado para estas variantes de la enfermedad (Clifford et al., 2001; Hacker et al.,

2008; Hoffman et al., 2001; Rechsteiner et al., 2011), la expresión de VHL llevó a una disminución en la actividad de HIF (Figura 46, Barra 3 vs Barra 1), pero las mutantes de VHL resultaron deficientes en esta función (Figura 46, Barras 5, 7 y 9 vs Barra 3). RSUME revirtió el efecto inhibitorio de VHL (Figura 46, Barra 4 vs Barra 3) y potenció la pérdida de función de las mutantes de VHL (Figura 46, Barra 6 vs Barra 5; Barra 8 vs Barra 7 y Barra 10 vs Barra 9).

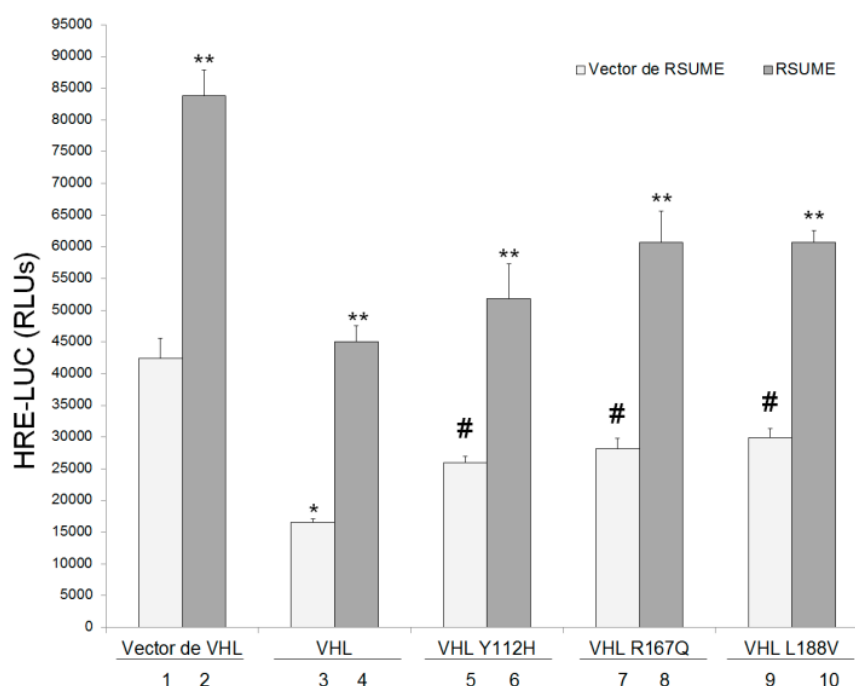


Figura 46: RSUME potencia la pérdida de función de las mutantes de VHL. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de cada una de las variantes de Flag-VHL-GFP indicadas o su vector control y/o 0,7 μ g de V5-RSUME o su vector control, 0,2 μ g de HA-HIF-2 α , 0,5 μ g del reportero de actividad de HIF, HRE-LUC y 0,3 μ g del reportero CMV- β -galactosidasa como control de carga. 24hs post-transfección las células fueron levantadas en buffer de lisis y la actividad de la Luciferasa Firefly fue medida. Cada valor fue normalizado a la actividad de la β -galactosidasa. Cada condición fue realizada por triplicado. Los valores se muestran como promedio \pm error estándar de un experimento representativo de tres ensayos independientes. *, $p < 0,05$ comparando VHL con la condición transfectada con su vector vacío; **, $p < 0,001$ comparando cada condición (vector vacío de VHL y cada una de las variantes indicadas) con la respectiva condición transfectada con el vector vacío de RSUME; # $p < 0,05$ comparando cada mutante de VHL con la condición transfectada con VHL_{WT} (barra 3) (ANOVA, seguido de test de Scheffé).

II.3 Mecanismo de acción de RSUME sobre las mutantes de VHL

II.3.1 RSUME promueve la sumoilación de las mutantes puntuales de VHL

Considerando la cercanía de los sitios de las mutaciones (Flag-VHL_{Y112H}, Flag-VHL_{R167Q} o Flag-VHL_{L188V}) al sitio consenso de sumoilación de VHL (K171), se evaluó si ésta modificación ocurría en las mutantes de la enfermedad VHL.

Se utilizaron extractos de células COS-7 transfectadas con Flag-VHL_{Y112H}, Flag-VHL_{R167Q} o Flag-VHL_{L188V} junto con Ubc-9 y His-SUMO-2. Estos se sometieron a cromatografía de afinidad de Niquel. Independientemente de las mutaciones, VHL mantuvo su capacidad de ser sumoilada, con un patrón similar al que se observa para la variante WT de VHL (Figura 47).

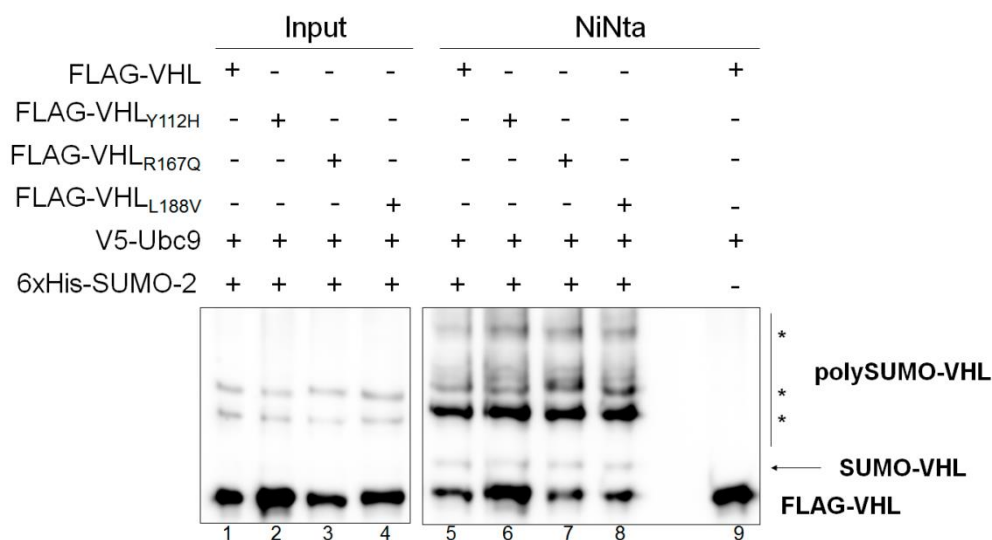


Figura 47: Las mutantes del síndrome VHL son blanco de sumoilación. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,6 μ g de cada una de las variantes indicadas de Flag-VHL, y/o 0,6 μ g de 6xHis-SUMO-2, 0,1 μ g de V5-Ubc9. A las 48 hs de la transfección las células fueron cosechadas, una alícuota fue tomada como Input y el resto de los extractos fueron utilizados para una cromatografía de afinidad con una resina de Ni²⁺ para purificar 6xHis-SUMO-2 (Ni-NTA). Las fracciones purificadas y los Input fueron sometidos a SDS-PAGE y posterior WB utilizando VHL. Se muestra un ensayo representativo de dos ensayos independientes son resultado similar.

Confirmar que las mutantes de VHL se sumoilan nos llevó a estudiar si RSUME actúa modulando positivamente su modificación. El silenciamiento de RSUME endógeno (siRSUME) en células COS-7 transfectadas con Flag-VHL_{Y112H}, Flag-VHL_{R167Q} o Flag-VHL_{L188V} junto con Ubc-9 y His-SUMO-2, mostró una clara disminución de los niveles de sumoilación de las mutantes estudiadas (Figura 48). Esto confirmó que RSUME es efectivamente un modulador positivo de la sumoilación de las mutantes de la enfermedad de VHL.

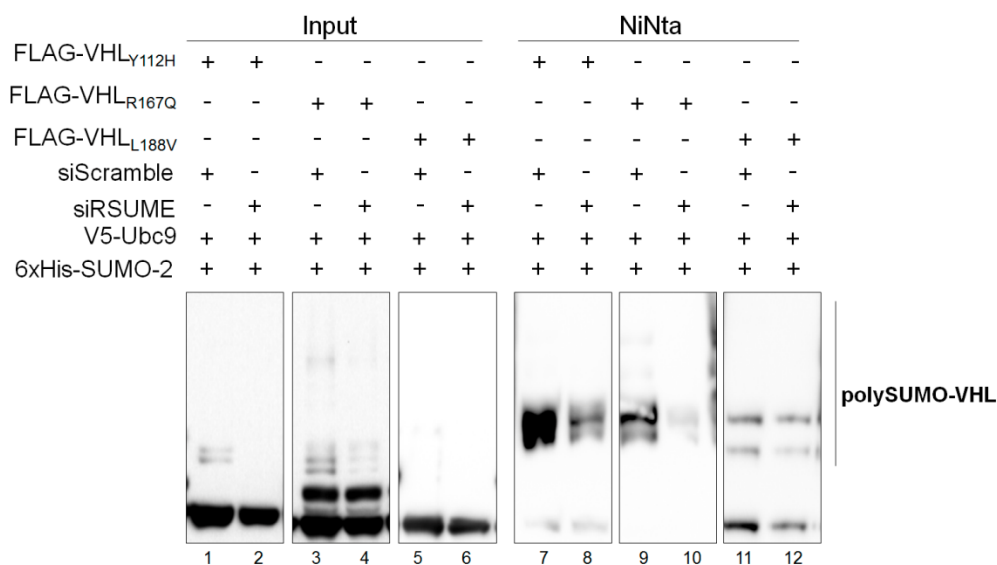


Figura 48: RSUME modula positivamente la sumoilación de las mutantes de VHL. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,6 μg de cada una de las variantes indicadas de Flag-VHL, y/o 0,6 μg de 6xHis-SUMO-2, 0,1 μg de V5-Ubc9 y siRNA contra RSUME (20 μM) o siScramble como control. A las 48hs de la transfección las células fueron cosechadas, una alícuota fue tomada como Input y el resto de los extractos fueron utilizados para una cromatografía de afinidad con una resina de Ni^{2+} para purificar 6xHis-SUMO-2 (Ni-NTA). Las fracciones purificadas y los Input fueron sometidos a SDS-PAGE y posterior WB utilizando VHL. Se muestra un ensayo representativo de dos ensayos independientes son resultado similar.

II.3.2 RSUME regula la actividad de las mutantes de RSUME independientemente de su sumoilación

Nos propusimos saber si en las mutantes de la enfermedad de VHL los efectos de RSUME son dependientes de su acción como modulador positivo de la sumoilación. Para ello, se generaron dobles mutantes de VHL, es decir, variantes de VHL que llevan la mutación representativa de la enfermedad VHL junto con la mutación K171R, obteniendo los siguientes plásmidos (Flag-VHL_{Y112H/K171R}, Flag-VHL_{R167Q/K171R} o Flag-VHL_{L188V/K171R}). Sobre estos, se chequeó por cromatografía de afinidad de Niquel que efectivamente hubiera reducción en la sumoilación (Figura 49).

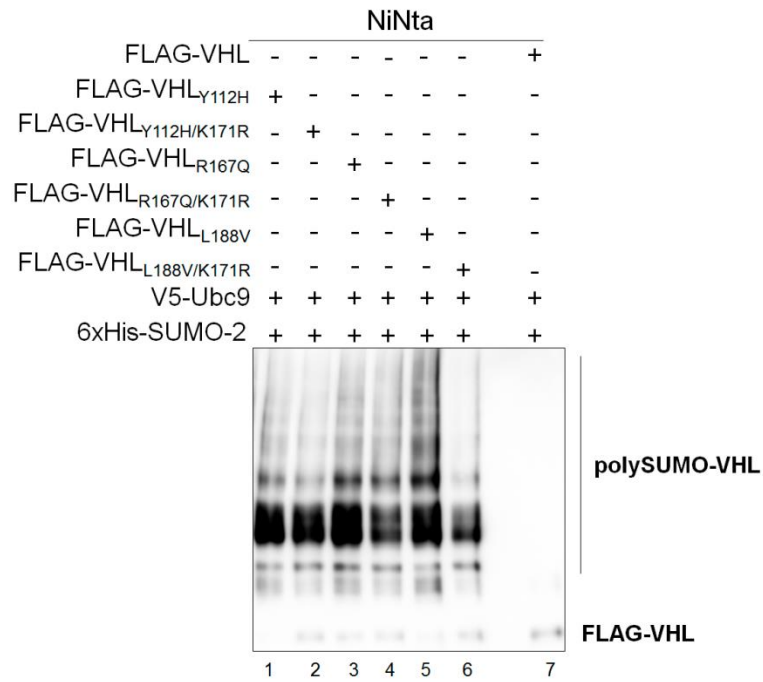


Figura 49: Chequeo de sumoilación en las doblas mutantes generadas. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,6 μ g de cada una de las variantes indicadas de Flag-VHL, y/o 0,6 μ g de 6xHis-SUMO-2, 0,1 μ g de V5-Ubc9. A las 48 hs de la transfección las células fueron cosechadas y los extractos fueron utilizados para una cromatografía de afinidad con una resina de Ni²⁺ para purificar 6xHis-SUMO-2 (Ni-NTA). Las fracciones purificadas y los Input fueron sometidos a SDS-PAGE y posterior WB utilizando VHL. Se muestra un ensayo representativo de dos ensayos independientes son resultado similar.

Ya sea en células COS-7 (Figura 50A) como en células RCC-786-O (Figura 50B) la sobre-expresión de RSUME aumentó la estabilidad de HIF-2 α , inhibiendo a las simples y dobles mutantes de VHL. Esto verifica la hipótesis de que RSUME no precisa de su acción como *enhancer* de sumoilación de VHL para potenciar la pérdida de función de las mutantes.

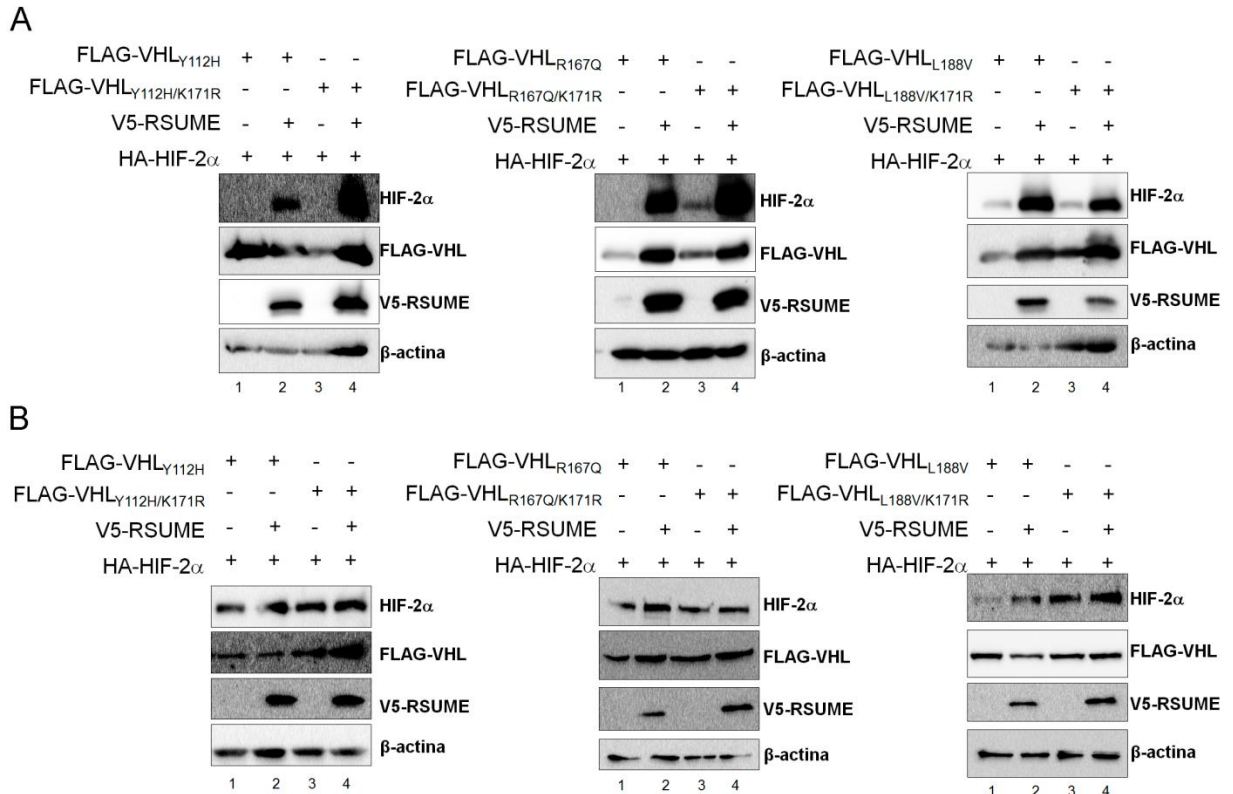


Figura 50: RSUME promueve la pérdida de función de las mutantes dobles de VHL. Células COS-7 (A) y RCC-786-O (B) fueron transfectadas con 1.0 μ g de los vectores de expresión de las variantes de VHL indicadas y/o 1,5 μ g RSUME o su vector control y 0,2 μ g de HA-HIF-2 α . 48hs post-transfección las células fueron sometidas cosechadas en Laemmli Buffer. Los extractos fueron sometidos a SDS-PAGE seguido de WB con los anticuerpos contra HIF-2 α , Flag, V5 y β -actina. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

II.3.3 RSUME interacciona con las mutantes de VHL afectando su unión a HIF-2 α

El paso siguiente para estudiar el mecanismo por el cual RSUME potencia la pérdida de función de las mutantes de VHL fue estudiar las consecuencias sobre la formación de complejos proteicos del sistema de degradación VHL-HIF.

En primera instancia, se evaluó si a pesar las mutaciones en VHL interacciona con RSUME. Tal como ya hemos demostrado para la variante VHL_{WT}, RSUME interaccionó con las diferentes mutantes de la enfermedad (Figura 51A), así como con las mutantes de la enfermedad que presentan el sitio de sumoilación mutado (Figura 51B).

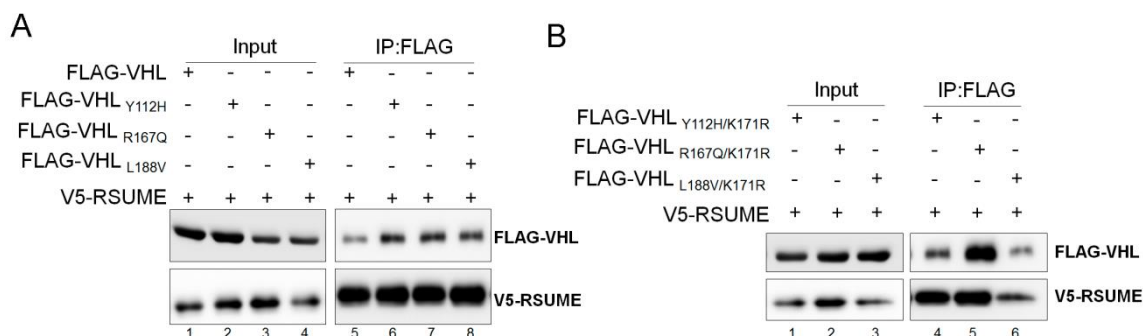


Figura 51: RSUME mantiene su unión con las mutantes de VHL independientemente del status de sumoilación de VHL. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 de Flag-VHL-GFP, Flag-VHL_{Y112H}, Flag-VHL_{R167Q} o Flag-VHL_{L188V} (A) O Flag-VHL_{Y112H/K171R}, Flag-VHL_{R167Q/K171R} o Flag-VHL_{L188V/K171R} (B) y 0,5 µg V5-RSUME. 48hs post-transfección las células fueron lisadas en Buffer RIPA y se desarrolló el protocolo para la inmunoprecipitación de VHL, utilizando el anticuerpo específico contra Flag. De cada condición ensayada se obtuvo un extracto crudo (Input) y una fracción correspondiente a la inmunoprecipitación. Ambos fueron sometidos a una electroforesis en SDS-PAGE y WB con el anticuerpo indicado. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

Acto seguido, a través del ensayo de inmunoprecipitación en tándem, verificamos que las mutantes de VHL, HIF-2α y RSUME forman, tal como con la variante WT (Figura 27), un complejo heterotrimérico. (Figura 52).

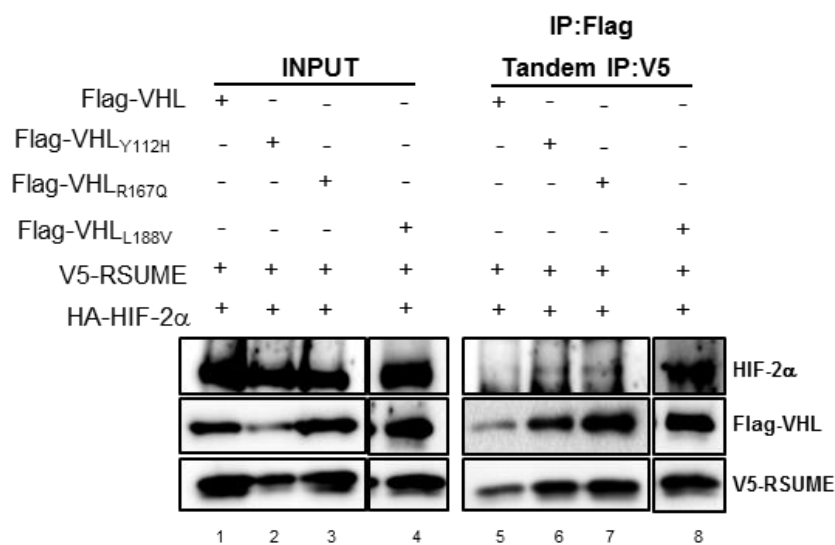


Figura 52: RSUME, HIF-α y las mutantes de VHL forman un complejo. Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 µg de HA-HIF-2α, 0,5 µg de las variantes indicadas de Flag-VHL-GFP y 0,5 µg de V5-RSUME. 48 horas post-transfección las células se incubaron en 2% de suero 5 µ MG-132 durante 6 horas. Las células se lisaron y se realizó una primera inmunoprecipitación (IP) usando anticuerpos anti-Flag. Se eluyeron las fracciones inmunoprecipitadas con péptido Flag soluble y se realizó una segunda IP con anticuerpos anti-V5. Las fracciones inmunoprecipitadas de la segunda IP (Tándem IP) y las alícuotas de lisado (Input) se sometieron a SDS-PAGE y WB usando los anticuerpos HA, Flag y V5. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes con resultados similares.

Cuando se centró el estudio en el complejo de degradación VHL-HIF, determinamos por inmunoprecipitación, que la interacción de RSUME con las mutantes de VHL trae

aparejado una disminución en su interacción con HIF-2 α (Figura 53), siendo este el posible mecanismo por el que RSUME lleva a la potenciación de la pérdida de función de las mutantes de VHL.

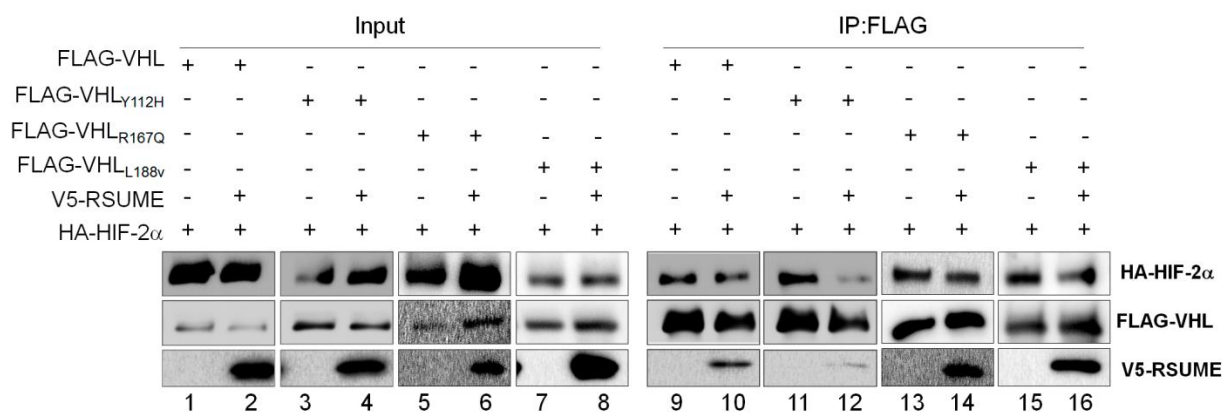


Figura 53: RSUME inhibe la interacción de las mutantes de VHL con HIF-2 α . Células COS-7 fueron transfectadas con 0,5 μ g de plásmido para HA-HIF-2, 0,5 μ g de cada una de las variantes de Flag-VHL-GFP indicadas y/o 0,5 μ g de V5-RSUME o sus plásmido control. 48hs post-transfección las células fueron incubadas por 6hs con el inhibidor de proteasoma MG-132 (5 μ M) en medio 2% suero. Las células fueron lisadas en Buffer RIPA y se desarrolló el protocolo para la inmunoprecipitación de VHL, utilizando el anticuerpo específico contra Flag. De cada condición ensayada se obtuvo un extracto crudo (Input) y una fracción correspondiente a la inmunoprecipitación. Ambos fueron sometidos a una electroforesis en SDS-PAGE y WB con el anticuerpo indicado. Se muestra una figura representativa de tres ensayos independientes con resultado similar.

Hay reportes que indican que las diferentes mutantes de VHL tienen afectada en diferente medida su capacidad de formar el complejo E3 ligasa de Ubiquitina ECV (Ding et al., 2014; Hacker et al., 2008; Kaelin, 2017). Con esto en consideración y que anteriormente hemos observado que la sobre-expresión de RSUME afecta la interacción entre VHL_{WT}, Elonguina C, Elonguina B y Cullina-2 (Tesis Licenciatura Lucas Tedesco, página 53 y Gerez et al., 2015), es que nos preguntamos si la pérdida de función de las mutantes de VHL por RSUME podría deberse a que la disminución de la interacción VHL-HIF impacte en la formación del complejo E3 ligasa de ubiquitina. Para ello, células COS-7 fueron transfectadas con los plásmidos que codifican para las mutantes de VHL indicadas en la Figura 54, los componentes del complejo ECV (Flag-Elonguina C, HA-Elonguina B y HA-Cullina-2) y RSUME. Se purificó VHL por inmunoprecipitación y se evaluó el efecto de RSUME sobre la unión de VHL a los componentes del complejo ECV. La sobre-expresión de RSUME trajo aparejado una disminución en la interacción directa entre las mutantes de VHL y Elonguina C (Figura 54). Esta disminución fue acompañada por una disminución en los niveles de Elonguina B que interaccionan indirectamente con VHL a través de la Elonguina C (Figura 54).

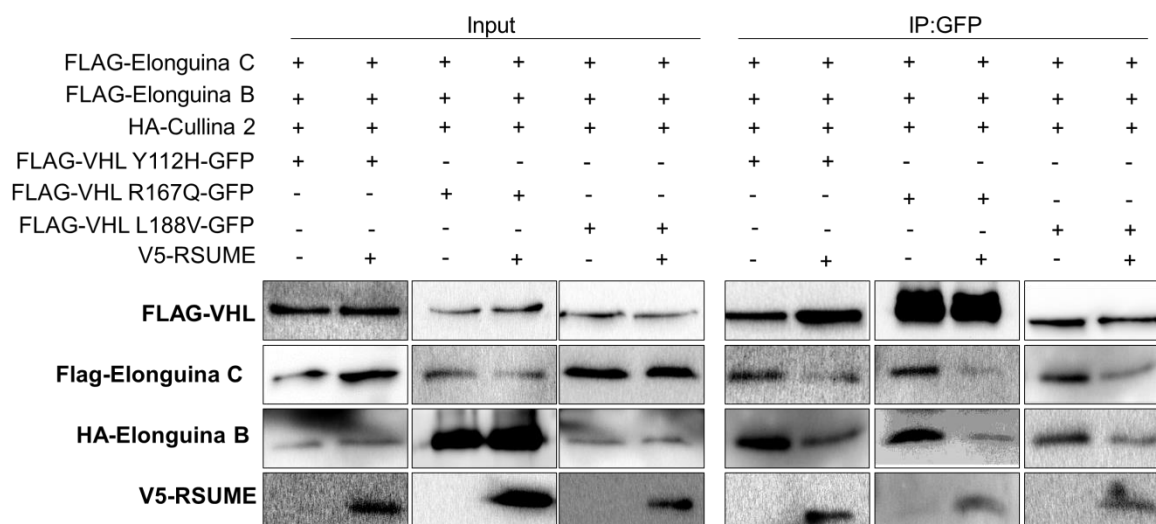


Figura 54: RSUME inhibe la interacción de las mutantes de VHL con los componentes del complejo E3 ligasa de Ubiquitina (ECV). Células COS-7 fueron transfectadas con 1,0 μ g de cada una de las variantes de Flag-VHL-GFP indicadas y/o V5-RSUME 1,0 μ g o sus plásmido control, 1,0 μ g de Flag-Elonguina C, 1,0 μ g de HA-Elonguina B y 1,0 μ g de HA-Cullina-2. 48hs post-transfección las células fueron lisadas en Buffer RIPA y se desarrolló el protocolo para la inmunoprecipitación de VHL, utilizando el anticuerpo específico contra GFP. De cada condición ensayada se obtuvo un extracto crudo (Input) y una fracción correspondiente a la inmunoprecipitación. Ambos fueron sometidos a una electroforesis en SDS-PAGE y WB con los anticuerpos FLAG, HA y V5. Se muestra una figura representativa de dos ensayos independientes con resultado similar.

Los resultados mostrados indican que a través de interferir con la formación de complejos de degradación de HIF- α , VHL-HIF y VHL-Elonguinas-Cullina, RSUME potencia la pérdida de función de las mutantes de VHL. La consecuencia directa de este mecanismo, es que se genere un ambiente celular pseudohipóxico en el que HIF se encuentra continuamente estable y activo. En este sentido, es que nos planteamos el objetivo de establecer de qué modo las condiciones generadas por RSUME impactan en el establecimiento del microambiente tumoral asociado al fenotipo VHL.

II.4 **RSUME impacta en VHL y con ello genera un escenario proangiogénico**

Dado que RSUME inhibe la función de VHL, incrementando la estabilidad y actividad de HIF, es que nos centramos en determinar si la acción de RSUME sobre VHL es suficiente para inclinar la balanza hacia un escenario proangiogénico.

Para estudiar la contribución de RSUME en el switch angiogénico asociado a un aumento en VEGF, se generaron clones estables en células RCC-786-O que expresan VHL, VHL_{K171R}, VHL_{L188V} o VHL_{L188V / K171R}, junto con un shRNA dirigido contra RSUME o su control scramble. Sobre estos clones se analizó el efecto del silenciamiento de RSUME sobre la expresión de VEGF. Ya sea para la variante salvaje de VHL como para la mutante VHL_{L188V}, el silenciamiento de RSUME llevó a una disminución en los niveles de expresión de VEGF, verificando que la expresión de RSUME impacta en la

funcionalidad de VHL (Figura 55). Estos mismos resultados fueron obtenidos para aquellos clones que expresan las variantes de VHL que no son sumoilables (VHL_{K171R} y VHL_{L188V / K171R}) (Figura 55), mostrando una vez más que los efectos de RSUME son independientes del estado de sumoilación de VHL.

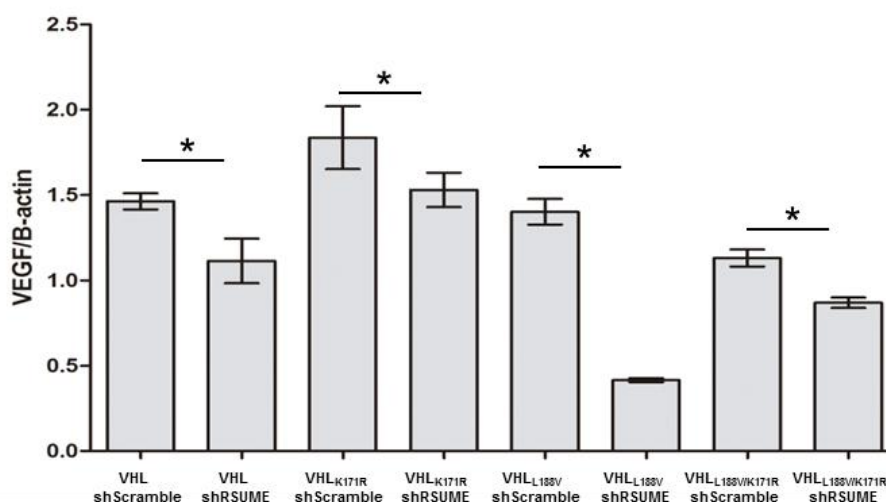


Figura 55: El silenciamiento de RSUME aumenta la función de VHL, disminuyendo la expresión de VEGF. Los clones RCC-786-O indicados fueron cosechados y los niveles de ARNm de VEGF-A fueron analizados mediante qRT-PCR. Cada valor fue obtenido a partir de cuadruplicados. Se muestran valores correspondientes al promedio \pm SEM, luego de normalizar a los valores de expresión del control de carga RPL19. *, $p < 0.05$ cada variante de VHL comparada con su respectivo control shScramble (ANOVA seguido de test de Scheffé). Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones independientes.

Se estudió el aporte de RSUME a la angiogénesis mediante dos estrategias experimentales: ensayo *in vitro* de formación de túbulos y ensayo de angiogénesis *in vivo* en ratones NOD/SCID.

Para el ensayo *in vitro* de formación de túbulos, células de la línea EA.hy926 fueron cultivadas sobre una base de Matrigel, junto con el medio condicionado obtenido de los clones estables que se mencionaron previamente (ver Materiales y Métodos). Estas células responden a factores proangiogénicos como es VEGF diferenciándose y formando estructuras tubulares y por ello, sirven como una herramienta testigo de diferencias en los niveles de secreción de VEGF al medio condicionado.

En línea con los resultados obtenidos de la expresión de ARNm de VEGF, cuando las células EA-hy926 fueron cultivadas con medios condicionados provenientes de clones en los que se había silenciado RSUME, se observó una significativa disminución del número de ramificaciones de los túbulos formados (Figura 56A). El impacto en la angiogénesis por silenciamiento de RSUME fue también corroborado para las mutantes de sumoilación de VHL (Figura 56B).

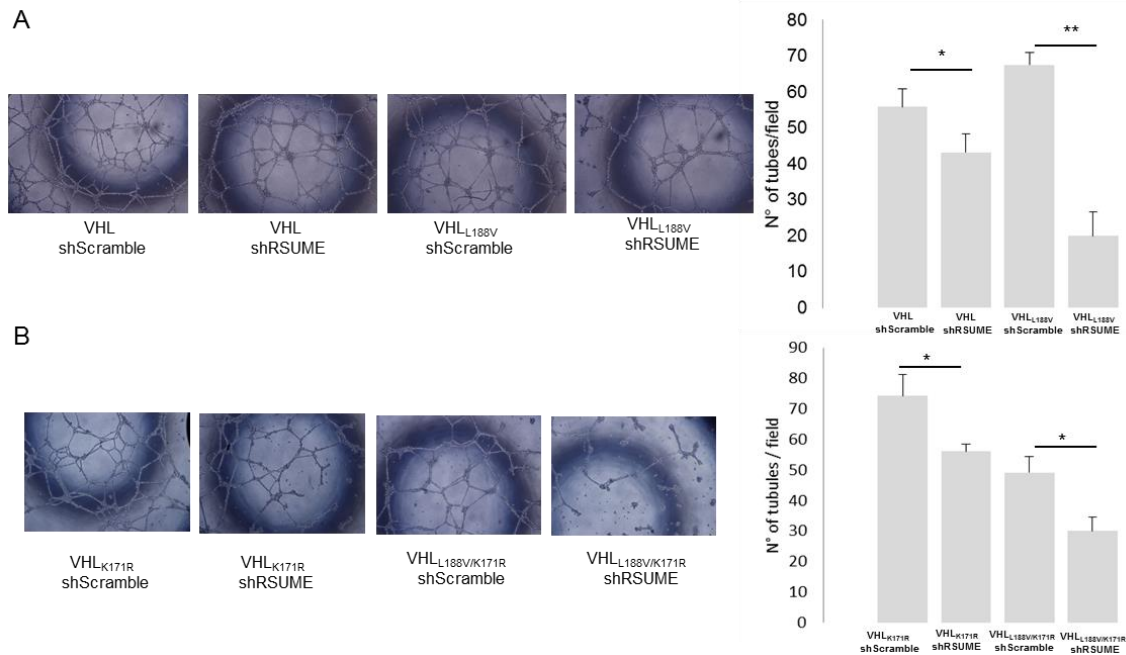


Figura 56: La disminución de VEGF produce una disminución de la angiogénesis es un modelo in vitro. 15.000 células Eahy.926 por pocillo de placa de 96 fueron incubadas con 100 µl de medio condicionado de los clones generados en las células RCC-786-O, sobre un colchón de Matrigel. Se tomaron fotografías a las 14-16 h después de la incubación usando un microscopio invertido (aumento: 5X). Cada condición se llevó a cabo por triplicado. Las ramificaciones por campo se cuantificaron utilizando ImageJ. Se muestra una imagen representativa para cada clon de tres experimentos independientes (panel izquierdo). Los valores se dan como la media de los nodos de ramificación ± SEM *, p <0.05 y **, p <0.01 comparado con el clon Scramble correspondiente (ANOVA con prueba de Scheffé). (panel derecho).

El papel de RSUME en el progreso *switch* angiogénico asociado a la función de VHL se demostró también en el modelo de angiogénesis *in vivo*. Ratones de la cepa NOD-SCID se inyectaron con los clones generados. A los 7 días de comenzado el experimento, los ratones presentaron nuevos vasos alrededor del área de inyección. Para aquellos clones que expresan el shRSUME se observó una disminución significativa en la densidad de vasos (Figura 57A), confirmando, *in vivo*, que en ausencia de RSUME, VHL_{WT} y la mutante Tipo 2 se vuelven más potentes y limitan la angiogénesis tumoral temprana. El silenciamiento RSUME también resultó en ganancia de función para las variantes de VHL deficientes en sumoilación (VHL_{K171R} y VHL_{L188V/K171R}) (Figura 57B).

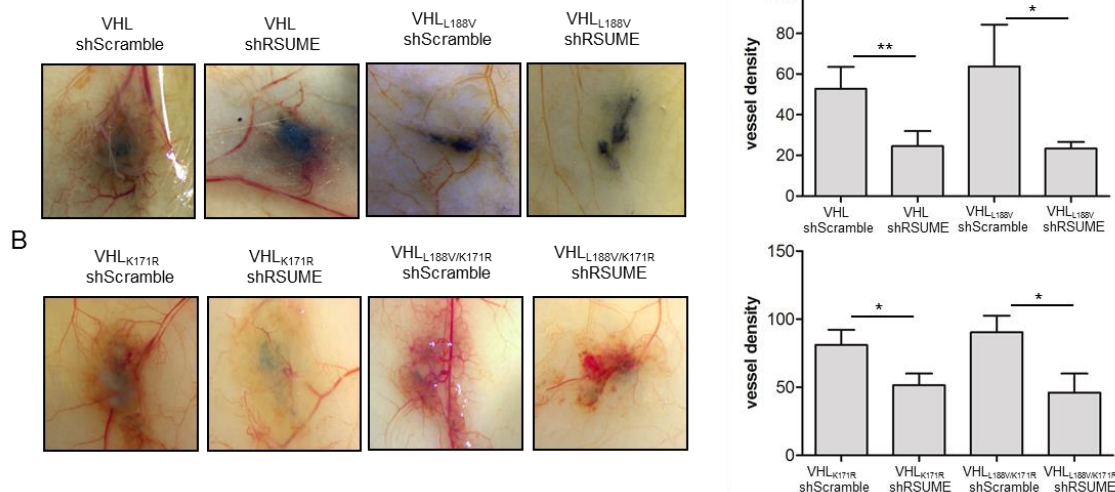


Figura 57: El silenciamiento de RSUME en clones RCC produce una disminución de la angiogénesis in vivo. Se inyectaron por vía intradérmica los clones indicados de células RCC-786-O (10^6 células, cada clon) en el flanco derecho de ratones macho Nod/Scid de 6-8 semanas. El vehículo fue inyectado en el flanco izquierdo (flanco contralateral). Después de 7 días, se retiró la piel y se tomaron fotografías con lupa (ver aumento). Se muestra un ratón con resultados similar a los demás de cada grupo (panel izquierdo). Se midieron los vasos pequeños y medianos y se calculó la densidad del vaso como $(\#vasos_{células} - \#vasos_{vehículo}) / \text{Área}$. Los resultados obtenidos de 8 imágenes independientes para cada condición se expresan como promedio \pm SEM (panel derecho). *, $p < 0.05$ y **, $p < 0.01$ comparado con el clon Scramble correspondiente (ANOVA con prueba de Scheffé).

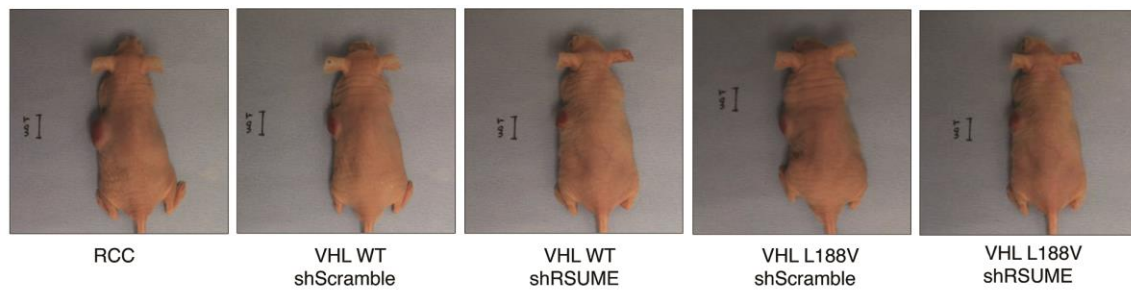
II.5 **RSUME está involucrado en la formación de tumores dependientes de la pérdida de función VHL**

Si bien nuestros resultados muestran que RSUME actúa en los estadios iniciales del *switch* angiogénico que llevarían al establecimiento de un escenario propenso para la formación de tumores, se estudió el impacto de RSUME sobre la función de VHL en el proceso de tumorigénesis asociado a la desregulación de HIF-2.

A lo largo de esta Tesis, utilizando numerosas estrategias experimentales, se ha demostrado que los efectos directos de RSUME sobre la función de VHL_{WT} o la mutante de VHL del Tipo 2 son independientes de la sumoilación de VHL. En este sentido, para estudiar la contribución a la tumorigénesis, solo nos focalizamos en los clones RCC en los que se ha silenciado o no RSUME que expresan VHL_{WT} o VHL_{L188V}. Los clones se inyectaron en el modelo animal de tumorigénesis (ratones *nude*). Al final del experimento se evaluaron el volumen tumoral, niveles de HIF-2 α , VEGF-A y el grado de vascularización de los tumores.

Los tumores se desarrollaron entre 50 y 90 días en ratones inyectados con células RCC-786-O o con los clones mencionados, observando un menor volumen en aquellos tumores originados a partir de clones en los que RSUME se encontraba silenciado (Figura 58).

A



B

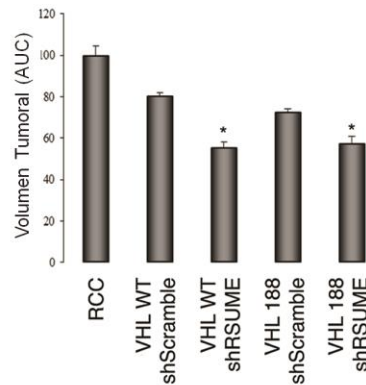


Figura 58: RSUME está involucrado en la formación de tumores dependiente de la pérdida de función de VHL.

(A) Clones de células RCC-786-O se inyectaron por vía subepidérmica en ratones atímicos nude machos (5×10^6 células, cada clon). Las fotografías mostradas se tomaron a los 70 d después de la inyección. Se muestra un ratón con resultados similares a demás ratones del mismo grupo. (B) Se muestra el cálculo del área bajo la curva (AUC) para el volumen del tumor. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM. *, $p < 0.05$ comparado con el clon Scramble correspondiente (ANOVA con prueba de Scheffé). Se realizaron dos experimentos independientes con cuatro ratones en cada grupo en cada experimento, que muestran resultados similares.

Además, se realizaron tinciones por inmunofluorescencia contra HIF-2 α y VEGF-A y por inmunohistoquímica, contra CD-31, para evaluar el grado de vascularización tumoral. Se verificó en un modelo *in vivo* que el silenciamiento de RSUME efectivamente resulta en un aumento de la funcionalidad de VHL_{WT} o la mutante Tipo 2. En comparación con su respectivo control shScramble, los clones con menor expresión de RSUME mostraron una significativa disminución de los niveles de HIF-2 α (Figura 59 A y B), resultando en una disminución en la expresión de su blanco transcripcional VEGF (Figura 59A, C y D) y en consecuencia, una menor vascularización tumoral (Figura 60A y B).

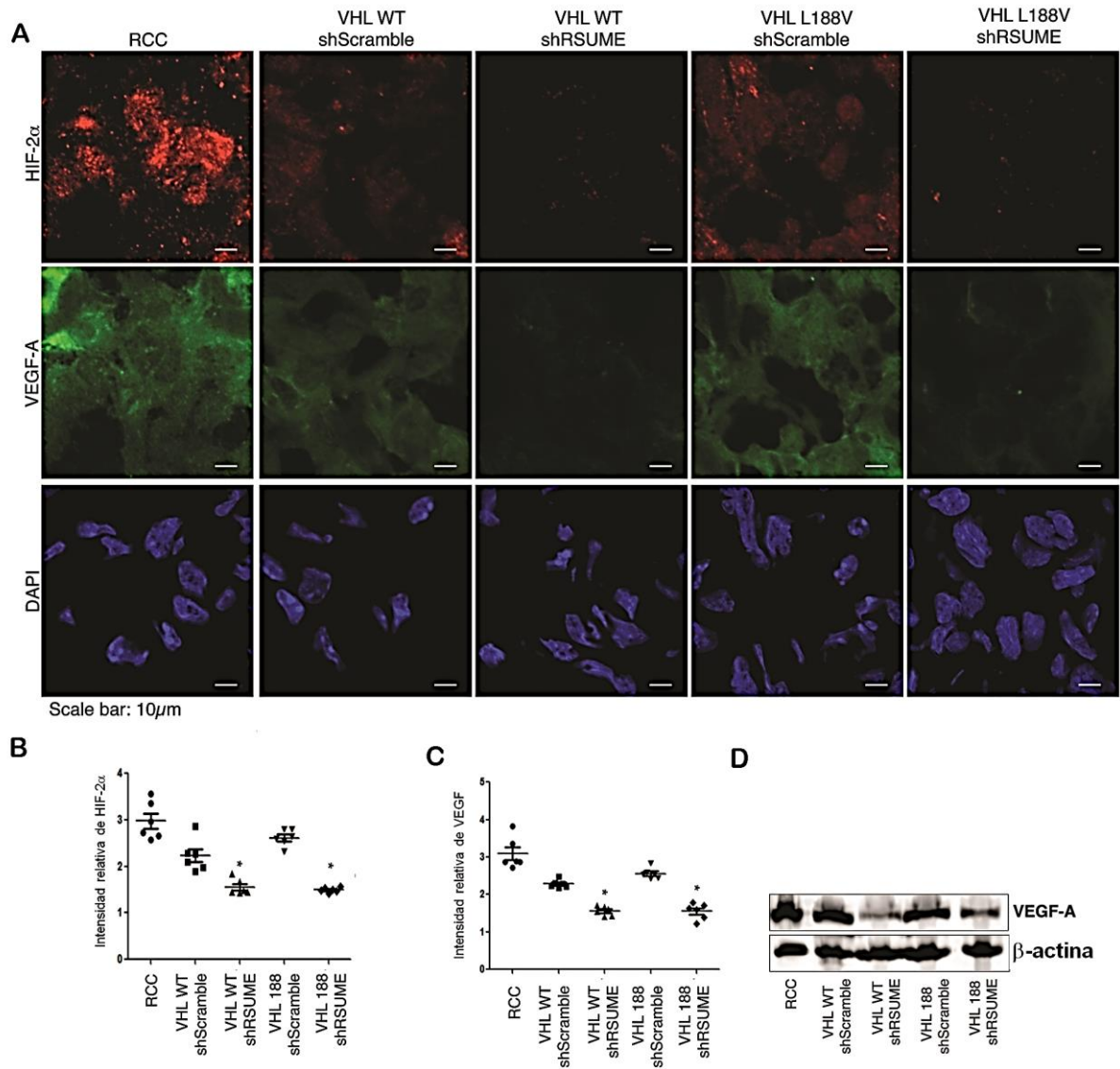


Figura 59: El silenciamiento de RSUME incrementa la función de VHL, disminuyendo los marcadores asociados a HIF en los tumores. (A) Se realizaron criosecciones de los tumores y se sometieron a inmunofluorescencia triple con los anticuerpos contra HIF-2 α (rojo) (1: 100), VEGF-A (verde) (1: 100) y DAPI para teñir los núcleos celulares (azul). Las imágenes se adquirieron con un aumento de 60x. Se muestra una imagen representativa para cada clon. (B y C) La intensidad de fluorescencia de HIF-2 (B) y VEGF-A (C) se cuantificó y relativizó a la señal DAPI. Los resultados obtenidos de 6 imágenes independientes para cada condición se expresan como promedio \pm SEM. *, $p < 0.05$ comparado con el clon Scramble correspondiente (ANOVA con prueba de Scheffé). (D) Se tomaron fragmentos de los tumores que fueron disgregados en forma mecánica. Los extractos se sometieron a SDS-PAGE y Western Blot (WB) usando los anticuerpos indicados. β -actina se usó como control de carga.

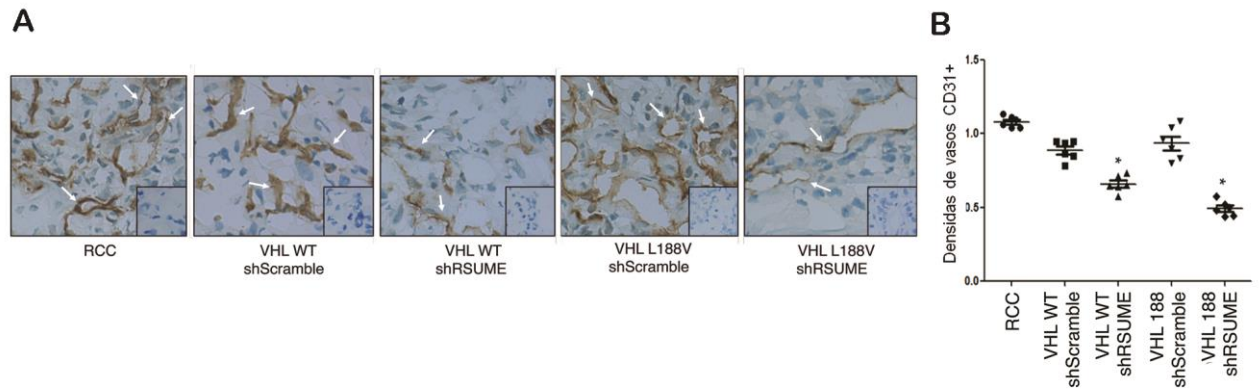


Figura 60: El silenciamiento de RSUME y concomitante ganancia de función de VHL resulta en tumores menos vascularizados. (A) Para visualizar la vascularización del tumor, las secciones tumorales se sometieron a inmunohistoquímica contra el marcador de células endoteliales CD31 (1: 500). Las imágenes se adquirieron a 40 aumentos. Los controles negativos correspondientes, omitiendo el anticuerpo primario se insertan en la esquina derecha de cada imagen. Se muestra una imagen representativa para cada clon. Las flechas indican células endoteliales CD31 + (marrón). (B) La densidad de vasos tumorales se determinó mediante cuantificación del área correspondiente a la señal positiva para CD31. Los resultados obtenidos de 6 imágenes independientes para cada condición se expresan como el promedio \pm SEM. *, $p < 0.05$ comparado con el clon Scramble correspondiente (ANOVA con prueba de Scheffé).

Los resultados que se muestran indican que, tanto para el establecimiento del escenario protumoral, como es el *switch angiogénico* (Folkman y Hanahan, 1991; Hanahan y Folkman, 1996), como durante el desarrollo y mantenimiento de los tumores del tipo VHL, el silenciamiento de RSUME resulta en una ganancia de función de VHL. Esto da cuenta que RSUME efectivamente repercute en la función de VHL y que es un factor que juega un papel clave en el impacto funcional de las mutaciones sobre VHL.

Discusión

La hipoxia es una condición crítica que afecta gravemente la supervivencia de la célula y por ello se han desarrollado mecanismos eficientes para resolver este escenario de estrés, siendo los factores HIF los principales efectores de la señalización asociada a la homeostasis del O₂ (De Lella Ezcurra et al., 2016; Semenza, 2007, 2012). Si bien existen numerosos mecanismos que regulan la estabilidad y actividad de HIF, VHL es el principal actor involucrado en impedir la estabilización de HIF en normoxia.

La actividad de HIF resulta crítica para el desarrollo y progresión de numerosos tumores y es considerada como un marcador de agresividad tumoral. Hay tumores que sobreviven a la falta de O₂ gracias a la activación de las vías de señalización asociadas a HIF (Schito y Semenza, 2016), mientras otros tumores que se generan por fallas en los reguladores de HIF en normoxia, como es el caso de VHL (Kaelin y Maher, 1998).

Desde el descubrimiento de HIF, los esfuerzos se han centrado en determinar los factores y mecanismos que modulan su estabilidad y actividad. El estudio de la interacción funcional entre VHL y HIF ha permitido grandes avances sobre las condiciones y factores que generan un escenario propicio para el desarrollo de tumores asociados a HIF, y con ello, el establecimiento de estrategias para el tratamiento de tumores VHL (Gossage et al., 2015; Kaelin, 2017). Aun así, existe un continuo interés en conocer nuevos factores y mecanismos que expliquen la pérdida de función de VHL, para aquellos casos en los que la proteína se expresa (Chen et al., 2016; Tarade y Ohh, 2018; Zhang y Zhang, 2018). En este sentido, en la presente Tesis hemos profundizado en los mecanismos moleculares y consecuencias que tiene RSUME sobre la función de VHL. RSUME interacciona con VHL afectando la formación de los complejos necesarios para su función E3 ligasa de Ubiquitina y la unión VHL-HIF.

La descripción de este mecanismo resultó de suma relevancia en el contexto de los tumores VHL, en los que RSUME se expresa. En particular, demostramos que mutantes de VHL con función disminuida, pierden la capacidad de regular negativamente la expresión de RSUME. En estas condiciones, RSUME mostró ser crítico para potenciar la pérdida de función de las mutantes de VHL sobre la estabilidad de HIF, generando un escenario propicio para la disregulación de la angiogénesis y formación de tumores VHL.

I. **RSUME modula positivamente los niveles de HIF**

I.1 ***Efecto de RSUME sobre los niveles de HIF en hipoxia***

Las subunidades de HIF-1 α y HIF-2 α son blanco de numerosas modificaciones post-traduccionales que modulan finamente su estabilidad y actividad. Dentro de este amplio espectro de modificaciones, nuestro laboratorio ha aportado evidencia sobre los efectos de la sumoilación de HIF-1 α en hipoxia, verificando, tal como otros (Bae et al., 2004; Chan et al., 2011; Han et al., 2015; Jiang et al., 2015; Li et al., 2014; Mei et al., 2014; Shao et al., 2004), que la hipoxia promueve la sumoilación de HIF-1, aumentando su estabilidad (Carbia-Nagashima et al., 2007). RSUME se encontró asociada a zonas hipóxicas de tumores y a una elevada capacidad angiogénica del tumor (Carbia-Nagashima et al., 2007; Castro et al., 2003; Shan et al., 2012). En línea con los trabajos antes mencionados que han descrito la estabilización de HIF-1 α por la sumoilación, RSUME modula positivamente la sumoilación de HIF-1 α en hipoxia, incrementando su estabilidad y actividad transcripcional (Carbia-Nagashima et al., 2007).

I.2 ***Acción de RSUME sobre la función de VHL en normoxia***

En los tumores asociados a la pérdida de función de VHL, se demostró que la degradación de HIF, por expresión de VHL ectópico, es suficiente para inhibir su crecimiento (Kondo et al., 2003; Kondo et al., 2002; Zimmer et al., 2004). El hecho de que RSUME disminuya la ubiquitinación de HIF-1, incrementando su estabilidad (Gerez et al., 2015 y Tesis Licenciatura Lucas Tedesco), nos llevó a estudiar a RSUME como modulador directo de la función de VHL y los mecanismos asociados a ello.

Estudiar la ubiquitinación y estabilidad de HIF-2 α , que comparte los mecanismos de regulación por VHL con HIF-1 α (Keith et al., 2011), en el modelo celular RCC-786-O (deficiente en VHL), fue crucial para confirmar que RSUME actúa sobre VHL inhibiendo la ubiquitinación de HIF-2 α , incrementando su estabilidad en normoxia. Adicionalmente, que RSUME no tenga efecto sobre la estabilidad de HIF-2 α endógena en ausencia de VHL, como se había observado con el dominio ODD (Tesis de Licenciatura Lucas Tedesco), es una clara evidencia de que RSUME actúa principalmente sobre los mecanismos que regulan la estabilidad de HIF vía el dominio ODD. Determinamos que en hipoxia, RSUME no produce un cambio significativo en los niveles de HIF-2 α , indicando que la acción de RSUME es principalmente sobre la

actividad de VHL. Si bien la regulación de VHL sobre HIF es la más estudiada, se han descrito numerosos factores que son reconocidos y ubiquitinados por VHL (Zhang y Zhang, 2018; Zhang y Yang, 2012). El estudio de la acción de VHL sobre estos blancos alternativos a HIF (Jung et al., 2012; Lai et al., 2011a), así como su desregulación por pérdida de función de VHL, ha brindado evidencias para el entendimiento de la heterogeneidad observada entre los diferentes tumores que surgen por mutaciones que impactan en la función de VHL. Esto ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias para el abordaje terapéutico de este tipo de tumores (Tarade y Ohh, 2018; Zhang y Zhang, 2018). Al determinar que RSUME revierte los efectos de VHL sobre las proteínas ER- α y p-160, demostramos que RSUME inhibe la función de VHL independientemente del sustrato de degradación que se trate. De este modo, RSUME surge como un factor clave que cuando inhibe a VHL, potencia la estabilización de una gran variedad de factores que contribuyen al establecimiento del fenotipo tumoral asociado a la pérdida de función de VHL.

La función más estudiada de VHL es la de actuar como proteína de reconocimiento de sustratos para la ubiquitinación. En particular, la regulación VHL-HIF ha demostrado ser de gran relevancia para el desarrollo de tumores en el síndrome VHL. Sin embargo, se ha visto que la desregulación de la actividad transcripcional de HIF no explica por completo el establecimiento de tumores asociados a la pérdida de función de VHL como RCC y Feocromocitomas (Calzada, 2010; Frew y Krek, 2008; Hergovich et al., 2003; Kaelin, 2017; Kim et al., 2006; Thoma et al., 2009). Por ello, el estudio de las funciones de VHL independientes de la regulación de HIF (Kaelin, 2004; Li y Kim, 2011; Tarade y Ohh, 2018), es actualmente considerado como un posible punto de partida para explicar por qué la pérdida de función de VHL lleva al establecimiento de diferentes tipos de tumores (Kaelin, 2017; Tarade y Ohh, 2018; Zhang y Zhang, 2018; Zhang y Yang, 2012). A partir de los resultados de esta Tesis, resulta necesario estudiar en profundidad el impacto de la expresión de RSUME sobre la estabilidad de otros blancos de degradación de VHL, así como determinar si RSUME promueve una ganancia o pérdida de función de VHL sobre las vías independientes a la ubiquitinación. Estos estudios permitirían comprender el rol de RSUME en el establecimiento de un escenario propicio para el desarrollo de tumores malignos asociados a VHL.

Las mutaciones en VHL generan pérdida total o parcial de VHL, generando una marcada acumulación de HIF y propagación de su respuesta transcripcional en normoxia (pseudohipoxia) (Bratslavsky et al., 2007; Jonasch et al., 2012; Rathmell y Simon, 2005; Schito y Semenza, 2016). Hay una correlación genotipo-fenotipo entre

las mutaciones de Tipo 2 en VHL y los tumores que se generan; el Tipo 2A con alto riesgo de formar Feocromocitomas y Hemangioblastomas; el Tipo 2B con alto riesgo de presentar Feocromocitomas, Hemangioblastoma y RCC y el Tipo 2C sólo forma Feocromocitomas (Nielsen et al., 2016; Nordstrom-O'Brien et al., 2010). Se ha visto que las diferentes mutantes de VHL varían en su capacidad de ubiquitinar a HIF (Hoffman et al., 2001; Knauth et al., 2006; Li et al., 2007). Hay reportes que muestran que los efectos de las mutaciones van desde una pérdida total de la función de VHL, asociada a los tumores más agresivos, hasta comportarse similar a VHL_{WT}, indicando que la tumorigénesis asociada a estas mutantes está ligada a otros factores o funciones de VHL independientes de HIF (Ding et al., 2014; Hacker et al., 2008; Hoffman et al., 2001; Li et al., 2007; Rathmell et al., 2004; Rechsteiner et al., 2011; Yang et al., 2013). Se han descrito más de 800 mutaciones que en su mayoría se localizan en regiones críticas para la regulación de HIF por VHL (zona de interacción con Elonguina C en el dominio α de VHL y la región de interacción con HIF α en el dominio β) (Nordstrom-O'Brien et al., 2010). Sin embargo, una gran cantidad de mutaciones caen por fuera de estas regiones (Shmueli et al., 2013). Esto muestra que la pérdida de función de VHL no es sólo por la capacidad de cada mutante de formar complejos con HIF y los componentes del complejo ECV, sino por la acción de otros factores y mecanismos aún no identificados (Kaelin, 2017).

RSUME se expresa en numerosos tipos de tumores, con alto potencial angiogénico (Carbia-Nagashima et al., 2007; Chen et al., 2018; Fuertes et al., 2018; Gerez et al., 2013; Gerez et al., 2015; He et al., 2017; Ji et al., 2018; Shan et al., 2012; Wu et al., 2016). Resaltando el rol de RSUME como biomarcador, éste fue asociado junto a otros 15 genes como un predictor de riesgo de recurrencia y metástasis en cáncer de mama (Huang et al., 2013; Schneider et al., 2015).

En favor de estudiar a RSUME sobre la función de VHL, se observó que RSUME se expresa en tejidos susceptibles a la formación de tumores del síndrome VHL (Carbia-Nagashima et al., 2007). Además, determinamos que efectivamente hay expresión de RSUME en tumores VHL (Feocromocitomas, Hemangioblastoma y RCC). Junto a esto, en un análisis llevado a cabo por el TCGA para caracterizar molecularmente a los tumores RCC (Haake et al., 2016; Ricketts et al., 2018), se encontró que RSUME está incrementado en un 20,07% de los 528 tumores analizados, correlacionando negativamente con la supervivencia de los pacientes. Estos estudios apoyarían un posible rol de RSUME como marcador a tener en cuenta en esta patología. Para validar estos datos y demostrar que RSUME es efectivamente un marcador pronóstico en la patología VHL, hemos establecido una colaboración con el Hospital Italiano de Buenos

Aires (reconocido como centro de referencia de la Alianza VHL). Se estudiará la expresión de RSUME en muestras de tumores del tipo RCC y Feocromocitoma, se compararán los niveles y patrón de expresión de RSUME en el tumor contra el tejido sano circundante y se realizarán correlaciones con datos de expresión de RSUME y los datos clínicos de los pacientes.

Si bien RSUME se expresa en diversos tipos de tumores (Carbia-Nagashima et al., 2007; Chen et al., 2018; Fuertes et al., 2018; Gerez et al., 2013; He et al., 2017; Huang et al., 2013; Ji et al., 2018; Schneider et al., 2015; Shan et al., 2012; Wu et al., 2016), resta por conocer los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de expresión de RSUME. Hasta el momento sólo se lo ha asociado a la hipoxia tumoral y a la expresión de HIF-1 α (Carbia-Nagashima et al., 2007; Shan et al., 2012). La caracterización molecular de los tumores RCC, muestra que la inactivación de VHL ocurre en un 60% de los casos (Haake et al., 2016; Ricketts et al., 2018). Utilizando mutantes características de VHL Tipo 2 con función disminuida (Tipo 2A VHL_{Y112H}, Tipo 2B VHL_{R167Q} y Tipo 2C VHL_{L188V}) (Ding et al., 2014; Hacker et al., 2008; Hoffman et al., 2001; Lee et al., 2009a; Rechsteiner et al., 2011) demostramos, a nivel transcripcional y proteico, que ante la pérdida de función de VHL, se pierde la capacidad de regular negativamente la expresión de RSUME. Considerando la expresión de RSUME en tumores RCC, Hemangioblastomas y Feocromocitomas, la inactivación de VHL explicaría en parte el mecanismo molecular asociado al incremento de los niveles de RSUME en el contexto patológico de la enfermedad VHL.

1.3 ***Acción de RSUME sobre las mutantes de VHL***

A pesar de los avances, aún es necesario describir factores y mecanismos que contribuyan al impacto de las mutaciones en la desregulación de la función de VHL (Kaelin, 2017; Tarade y Ohh, 2018). Dado que los niveles de RSUME incrementan en presencia de las mutantes de VHL y que éste actúa sobre VHL inhibiendo su actividad E3 ligasa de Ubiquitina, es en el contexto de la enfermedad de VHL donde cobra relevancia estudiar la acción de RSUME sobre la función de VHL, con foco en las mutantes de VHL.

Utilizando el reportero de estabilidad de HIF-1 α (ODD-LUC) (Tesis de Licenciatura Lucas Tedesco), recopilamos el fenotipo de diferentes mutantes representativas de la enfermedad VHL (Tipo 2A VHL_{Y112H}, Tipo 2B VHL_{R167Q} y Tipo 2C VHL_{L188V}). Como había sido reportado (Ding et al., 2014; Hacker et al., 2008; Hoffman et al., 2001; Lee et al., 2009a; Rechsteiner et al., 2011), las mutantes de VHL resultaron parcialmente activas. En este sistema, mientras que la sobre-expresión de RSUME genera una

pérdida total de la función de las mutantes de VHL, el silenciamiento de RSUME genera una ganancia de función, a niveles similares a VHL_{WT} (Tesis Licenciatura Lucas Tedesco). La correlación negativa entre los niveles de RSUME y la función de las mutantes de VHL, muestra que RSUME es un factor clave a tener en cuenta a la hora de estudiar el impacto funcional de las mutaciones en VHL. Avanzando en los efectos de RSUME sobre las mutantes de VHL, en la presente Tesis nos focalizamos en la estabilidad y actividad de HIF-2 α , cuya desregulación es crítica para la formación y mantenimiento de los tumores RCC, en vez de HIF-1 α (Kondo et al., 2003; Kondo et al., 2002; Rankin et al., 2006; Zimmer et al., 2004). Si bien el reportero ODD-LUC es una herramienta ampliamente aceptada, hemos avanzado en la comprensión de la acción de RSUME a través de analizar la estabilidad de la proteína HIF-2 α completa. En este sistema, los niveles de HIF-2 α surgen del balance de modificaciones que afectan positiva o negativamente su estabilidad, en vez de quedar circunscriptos solo al dominio ODD. La presencia de RSUME bloquea la actividad residual de las mutantes de VHL, incrementando aún más la estabilidad y actividad transcripcional de HIF y con ello, activa la vía de señalización de VEGF y angiogénesis.

Según los sistemas y modelos celulares utilizados, el impacto funcional de las mutaciones de VHL varía (Bae et al., 2004; Hoffman et al., 2001; Knauth et al., 2006; Knauth et al., 2009; Lee et al., 2009a; Rathmell et al., 2004). En un sistema con RSUME endógeno, como son las células RCC-786-O, la función parcialmente disminuida de las mutantes de VHL se reestablece cuando se silencia RSUME. Esto muestra que en el contexto celular RCC, RSUME dirige el impacto de las mutaciones en la función de VHL. Con esto en consideración, la heterogeneidad del impacto funcional de las mutaciones en VHL, para diferentes sistemas, podría estar dada por diferentes niveles de co-expresión de RSUME.

II. Mecanismo de acción de RSUME sobre VHL

A través de la caracterización molecular de diferentes mutantes de VHL y mediante estudios *in silico*, es que se ha descrito cómo repercuten las mutaciones de VHL en su función (Gossage et al., 2014; Nielsen et al., 2016; Nordstrom-O'Brien et al., 2010). Sin embargo, más allá de RSUME, no se han descrito factores que potencien el fenotipo de las mutaciones. RSUME ejerce su acción sobre VHL promoviendo la estabilización de numerosos blancos de ubiquitinación de VHL. La estabilización desregulada de estas proteínas (Tarade y Ohh, 2018; Zhang y Zhang, 2018; Zhang y Yang, 2012) contribuye al establecimiento del escenario celular para el desarrollo de los diferentes tipos de tumores dependientes de VHL. Por ello, conocer el mecanismo

molecular de acción de RSUME sobre VHL significó un gran avance en la posibilidad de inclinar la balanza en favor de la función de VHL.

II.1 **Caracterización de la interacción entre RSUME y VHL**

Habíamos demostrado que RSUME y VHL co-precipitan (Gerez et al., 2015), pero mediante la inmunoprecipitación, no es posible establecer si las interacciones encontradas son directas o si hay un intermediario involucrado. En el laboratorio se había demostrado que RSUME y los factores HIF- α interactúan (Carbia-Nagashima et al., 2007). Considerando la unión VHL-HIF, este último podría estar actuando como intermediario en la interacción VHL-RSUME. Para comprender los mecanismos involucrados en la inhibición funcional de RSUME sobre VHL, fue crítico establecer si fehacientemente existe el complejo VHL-RSUME. A través de un abordaje *in vitro* confirmamos que las proteínas recombinantes interactúan físicamente.

II.2 **Acción de RSUME sobre los complejos de VHL**

A lo largo de VHL se dan interacciones con más de 150 factores, de los cuales algunos han sido asociados a la tumorigénesis (Razafinjatovo et al., 2016) y base de datos VHLdb (<http://vhldb.bio.unipd.it/>). VHL tiene dos regiones de interacción ampliamente estudiadas (zona de reconocimiento a HIF y zona de reconocimiento de Elonguina C y Cullina-2), que han sido de gran utilidad para el diseño de inhibidores de VHL (Buckley et al., 2012; Galdeano et al., 2014; Van Molle et al., 2012). A través de un *screening* con una librería de compuestos, un abordaje computacional y posterior validación por NMR y cristalografía de rayos X, se descubrió una zona de interacción en VHL (Lucas et al., 2018). La formación de un complejo entre VHL, HIF y RSUME, dio un primer indicio de que los sitios de unión de VHL a HIF y RSUME serían distintos. En este sentido, la nueva región de interacción de VHL, que se encuentra cercana al sitio de unión a HIF (Lucas et al., 2018), debe ser tomada en cuenta a la hora de analizar el sitio de interacción entre RSUME y VHL. Se realizarán ensayos para mapear con precisión los sitios de unión entre RSUME y VHL expresando variantes truncas de VHL o de RSUME y se evaluará para cada caso, cuando se ve afectada la interacción directa de las proteínas. En particular, se mutarán los aminoácidos en el nuevo bolsillo de interacción de VHL. Conocer las regiones involucradas en la interacción VHL-HIF brinda la posibilidad de tener una potencial herramienta para desplazarla y con ello, disminuir las consecuencias funcionales de la formación de este complejo.

Entre las mutaciones en VHL, algunas afectan las uniones de VHL con los distintos factores descritos y se ha propuesto que esto contribuye a la heterogeneidad y agresividad de los tumores VHL (Crespigio et al., 2018; Lai et al., 2011b, 2012; Leonardi et al., 2009; Razafinjatovo et al., 2016; Tabaro et al., 2016). Para las mutantes de VHL Tipo 2 estudiadas, demostramos que RSUME interactúa con ellas y de hecho, conforma complejos HIF-VHL-RSUME. Considerando que RSUME lleva a la pérdida de función de las mutantes de VHL, sería de gran interés establecer si las mutantes de VHL presentan una conformación que facilite su interacción con RSUME. Ya sea sobre VHL_{WT} o las mutantes representativas del síndrome VHL, RSUME afecta negativamente la unión VHL-HIF1 α y VHL-HIF-2 α , lo que explica por qué en presencia de RSUME, hay una clara disminución en los niveles de ubiquitinación de las subunidades de HIF- α .

A estos resultados se suma que RSUME inhibe el reclutamiento de los componentes del complejo ECV a VHL_{WT} y a las mutantes, inhibiendo la actividad E3 ligasa de Ubiquitina. Además de HIF, RSUME revierte la degradación, vía VHL, de ER- α y p-160. Con esto en consideración, la disminución en el ensamblado del complejo E3 ligasa de Ubiquitina, explicaría la estabilización de más de un blanco de degradación de VHL.

Se ha demostrado que dentro de las diferentes mutantes de VHL Tipo 2, las que se estudian en la presente Tesis mantienen cierta capacidad de unirse a HIF (Clifford et al., 2001). Además, las mutaciones en la región correspondiente a la unión de VHL a la Elonguina C (VHL_{R167Q}) no afectan este reclutamiento en su totalidad (Ding et al., 2014; Hacker et al., 2008), lo que explicaría por qué la disminución la función de las mutantes sobre HIF, es parcial. Los resultados obtenidos sobre la unión a HIF y la formación del complejo ECV, sugieren fuertemente que la interferencia en las interacciones de VHL, necesarias para su función, constituirían parte del mecanismo de acción inhibitoria de RSUME.

Para conocer en mayor profundidad la acción de RSUME sobre VHL, sería interesante analizar qué ocurre con la unión de VHL a otros factores descritos. Esto podría hacerse mediante el análisis del interactoma de VHL en el contexto celular del síndrome VHL, comparando células *knock out* para RSUME contra su control. Un abordaje de este tipo podría significar el descubrimiento de nuevos factores y/o vías de señalización por los cuales RSUME promueve la formación de tumores dependientes de VHL y brindaría evidencias sobre aquellos procesos independientes de HIF modulados por RSUME.

II.3 ***RSUME como modulador de la sumoilación de VHL***

La sumoilación y de-sumoilación de proteínas juega un papel muy importante en la regulación de la respuesta adaptativa a hipoxia por HIF. De hecho, se ha visto que un incremento global de la sumoilación brinda resistencia a la isquemia y a la baja disponibilidad de oxígeno y glucosa (Bernstock et al., 2016; Cimarosti et al., 2012; Lee et al., 2016; Lee et al., 2009b; Lee et al., 2011; Shao et al., 2004). Numerosos reportes muestran que modula la actividad y estabilidad de HIF modificando directamente a las subunidades de HIF- α (Bae et al., 2004; Berta et al., 2007; Carbia-Nagashima et al., 2007; Chan et al., 2011; Cheng et al., 2007; Han et al., 2015; Jiang et al., 2015; Kang et al., 2010; Li et al., 2014; Mei et al., 2014; Nunez-O'Mara y Berra, 2013; Ulrich, 2007; van Hagen et al., 2010). Además, la dinámica sumoilación y de-sumoilación sobre otros factores asociados a la vía de señalización de HIF como la de-sumoilación del co-activador CBP/p300 (Huang et al., 2009), la sumoilación del Factor Asociado a HIF (HAF) (Koh et al., 2015) y la sumoilación de VHL (Cai y Robertson, 2010; Cai et al., 2010; Chien et al., 2013) entre otros, ha mostrado ser relevante para el establecimiento de la respuesta adaptativa al estrés hipóxico.

En la presente Tesis nos centramos en la sumoilación de VHL y los efectos que tiene esta modificación sobre su función. Fue reportado, que en hipoxia, la sumoilación de VHL es de relevancia para su función como supresor tumoral (Cai y Robertson, 2010; Cai et al., 2010; Chien et al., 2013). VHL es sumoilado principalmente en la Lisina 171 (Cai et al., 2010). La hipoxia aumenta los niveles de PIAS γ , que se une a VHL e incrementa su sumoilación. Los autores muestran que la sumoilación de VHL compite contra ubiquitinación, siendo la sumoilación responsable de la oligomerización de VHL y posterior acumulación en el núcleo. En este caso, la sumoilación de VHL afecta negativamente su función como supresor tumoral en procesos dependientes e independientes de HIF (Cai y Robertson, 2010; Cai et al., 2010). Posteriormente, otro grupo mostró, en el mismo modelo celular, que la sumoilación de VHL es necesaria para que VHL se localice en el núcleo y regule la citocinesis, manteniendo la estabilidad cromosómica (Sinha et al., 2011). Al igual a lo que observamos en la presente Tesis, los autores muestran que la mutante de sumoilación de VHL mantiene su capacidad de degradar a HIF-2 α , pero observan un incremento de los niveles de VEGF asociado a funciones independientes de HIF-2 (Sinha et al., 2011).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, que RSUME modula negativamente la función de VHL (Gerez et al., 2015) y que es un modulador positivo de la sumoilación (Carbia-Nagashima et al., 2007), estudiamos el aporte de RSUME a la sumoilación de VHL, demostrando que es un modulador positivo de esta modificación. Mediante

diferentes abordajes, corroboramos que RSUME promueve la pérdida de función de VHL por una vía independiente de su sumoilación, ya sea a nivel de la estabilidad como de actividad transcripcional de HIF-2. En cuanto al mecanismo molecular propuesto para la inhibición funcional de RSUME sobre VHL, RSUME disminuye la unión VHL-HIF, independientemente de la sumoilación.

Desde el descubrimiento de RSUME, no se había reportado que RSUME pudiera actuar sobre sus diferentes blancos más allá de su rol como modulador positivo de la sumoilación (Carbia-Nagashima et al., 2007; Druker et al., 2013; Gerez et al., 2013; Gerez et al., 2015; Wu et al., 2016). En este sentido, los hallazgos aquí mostrados sobre la regulación de la función de VHL, describen por primera vez que RSUME no sólo es un promotor de la sumoilación sino que regula a otras proteínas a través de la formación de complejos proteicos que modifican su función.

Profundizando en los mecanismos que subyacen a la acción de RSUME sobre las mutantes de VHL, en la presente Tesis se demostró por primera vez que las mutantes de VHL son blanco de sumoilación y que es incrementada por RSUME. La generación de las dobles mutantes de VHL (mutantes puntuales de la enfermedad que además tienen mutado el sitio de sumoilación), sirvieron para verificar que RSUME interacciona con las mutantes de VHL y disminuye su acción sobre HIF-2 α , independientemente de la sumoilación de VHL.

Considerando los resultados obtenidos, nos es posible plantear un mecanismo modelo en el que RSUME interacciona con VHL_{WT} o las mutantes e independientemente del estado de sumoilación de las diferentes variantes de VHL, afecta la formación del complejo E3 ligasa de Ubiquitina ECV y disminuye la unión de VHL con las subunidades HIF- α . Todo esto lleva a una disminución en la ubiquitinación de HIF, acompañado por un incremento en su actividad transcripcional (Figura 61). En el contexto de la enfermedad VHL, postulamos que como consecuencia de la pérdida de función de VHL, RSUME incrementa su expresión. Una vez superado un umbral ("condición patológica"), RSUME actúa inhibiendo la función de VHL, llevando a la célula a un escenario pseudohipóxico con HIF continuamente activo.

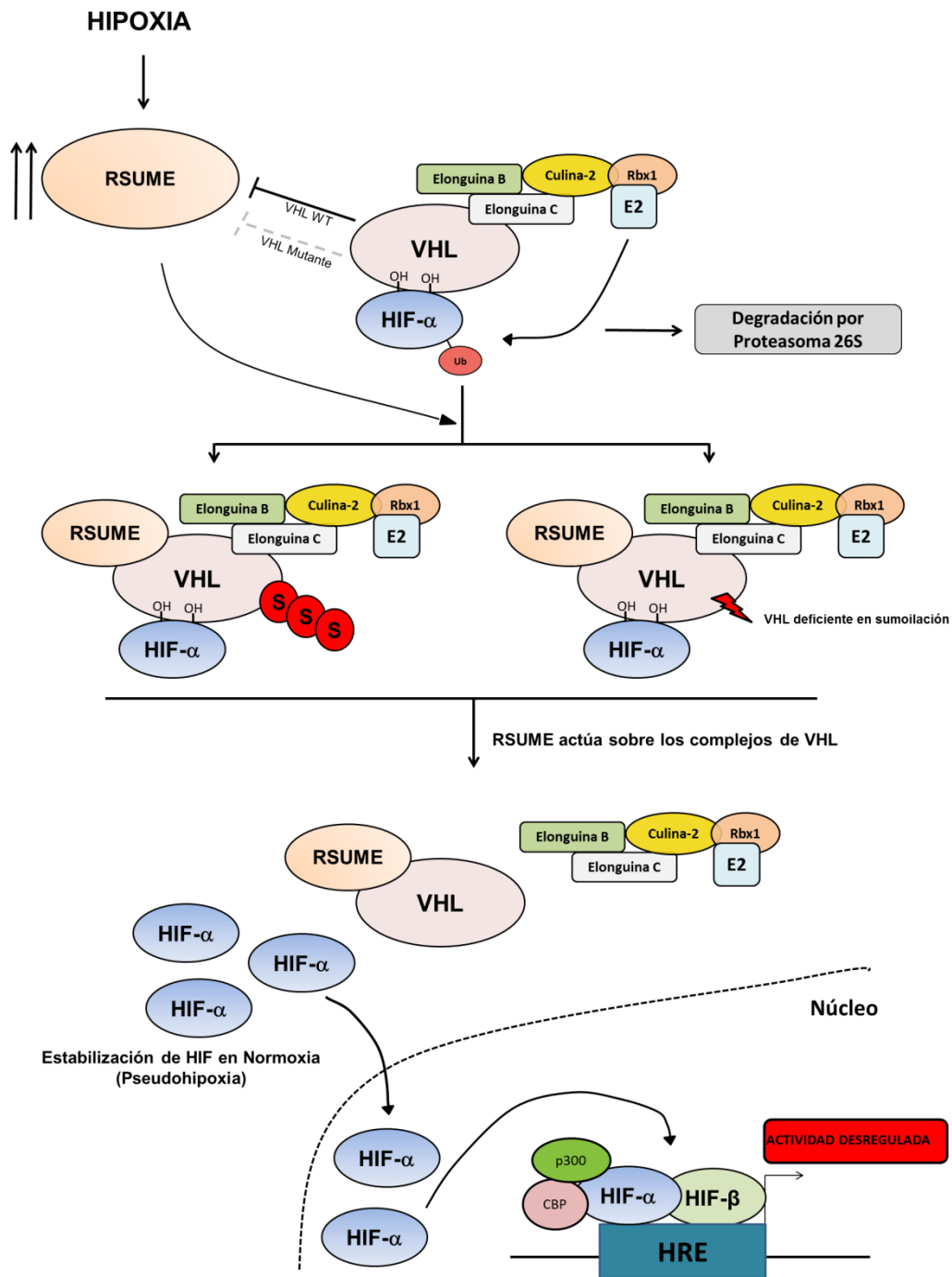


Figura 61: Esquema resumiendo los resultados obtenidos para la acción de RSUME sobre las variantes de VHL. Ante un incremento en los niveles de RSUME, este interacciona con VHL. Ya sea sumoilando a VHL o en ausencia de esta modificación, RSUME impacta sobre la formación/estabilidad de los complejos ECV y VHL-HIF y como consecuencia HIF se estabiliza, aumentando su actividad transcripcional.

III. Rol de RSUME en el establecimiento del fenotipo angiogénico tumoral

Las mutaciones en VHL que impactan sobre su función, generan un escenario permisivo para la desregulación de la angiogénesis (Kaelin, 2017; Schito y Semenza, 2016). Debido a los altos niveles de VEGF, la vascularización anómala es una

característica distintiva de los tumores asociados a esta enfermedad como RCC y Hemangioblastoma (Barata et al., 2017; Garcia-Donas et al., 2013; Jonasch et al., 2012; Varshney et al., 2017; Wang et al., 2017; Zecchin et al., 2015; Zhuang et al., 2014) y es clave para la adaptación a la hipoxia propia del tumor (Folkman y Hanahan, 1991; Hanahan y Folkman, 1996). Los abordajes contra los RCC y Hemangioblastomas se han centrado en inhibir a VEGF (Barata et al., 2017; Soni y Padwad, 2017; Varshney et al., 2017) y últimamente se desarrollaron inhibidores dirigidos contra HIF-2 (Coleman y Ratcliffe, 2009; Metelo et al., 2015; Toledo, 2017). A pesar de los avances, ocurren “fenómenos de escape” que llevan a que haya resistencia a los tratamientos (Coleman y Ratcliffe, 2009; Hlushchuk et al., 2011; Iwamoto et al., 2015; Zecchin et al., 2015). Por ello, se busca establecer terapias que actúen río arriba en la angiogénesis, ya que vías independientes de HIF que se desregulan por pérdida de función de VHL, contribuyen a la resistencia tumoral (Tarade y Ohh, 2018; Zhang y Zhang, 2018; Zhang y Yang, 2012).

En línea con esto, en un modelo de celular de Hepatocarcinoma, se vio que actuar a nivel de VHL, estimulando su función (aumento de expresión), es suficiente para que se dé una significativa reducción en los niveles y actividad de HIF-1 y HIF-2, en la expresión anormal de VEGF y consecuentemente se genere una disminución en la vascularización tumoral (Iwamoto et al., 2015). Incrementar la función de las mutantes de VHL, es una estrategia que ha sido utilizada en tumores RCC con síndrome VHL (Ding et al., 2014). Los autores muestran que la estabilización de la mutante VHL_{Q167R} con inhibidores del proteasoma, es suficiente para que se normalice la regulación de la vía de HIF y se inhiba el crecimiento tumoral (Ding et al., 2014).

A partir de la descripción molecular de la acción directa de RSUME sobre VHL, RSUME surge como un factor que interviene río arriba en las vías de señalización afectadas por VHL, como la angiogénesis derivada de HIF. Para demostrar la relación funcional entre VHL y RSUME en la progresión del fenotipo de la enfermedad VHL, en un contexto fisiológico, generamos líneas estables para distintas variantes de VHL que expresan diferentes niveles de RSUME. De este modo, establecimos un modelo celular de tumores RCC asociados a VHL, en el que se pudo validar el rol de RSUME en la pérdida de función de las mutantes de VHL, con consecuencias en la angiogénesis y crecimiento tumoral.

Nuestros resultados confirman la correlación negativa entre los niveles de RSUME y la función de VHL, previamente demostrada (Gerez et al., 2015). El silenciamiento de RSUME trae aparejado un aumento en la función de VHL_{WT} y la mutante VHL_{L188V}, evidenciado por una disminución en la expresión de VEGF y una significativa reducción de la capacidad de mediar la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*. En

línea con los resultados obtenidos para la vascularización durante etapas iniciales del establecimiento tumoral, los clones con reducida la expresión de RSUME desarrollan tumores de menor tamaño. Estos presentan una significativa reducción de los niveles de HIF-2 α , su blanco transcripcional VEGF y con ello, en la vascularización tumoral. Esto va en línea con resultados que muestran que la reintroducción de VHL (Gnarra et al., 1996; Iliopoulos et al., 1995) o la inhibición de HIF (Kondo et al., 2003; Kondo et al., 2002; Zimmer et al., 2004) suprimen el crecimiento tumoral. Si bien hemos observado una disminución en el tamaño de los tumores obtenidos, el silenciamiento de RSUME no evitó su aparición. Una razón que explique esto podría ser que se utilizó un shRNA, cuya eficiencia de silenciamiento no es total. Esto podría abordarse mediante la generación de una línea RCC *knock out* para RSUME.

A través de los abordajes sobre la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*, así como el de tumorigénesis *in vivo*, fue posible analizar el rol de RSUME en un contexto fisiológico. Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de RSUME es un posible abordaje para incrementar la función de VHL o las mutantes (Figura 62), normalizando la vía de señalización de HIF. Hemos validado los hallazgos a nivel molecular, en el contexto tumoral. RSUME actúa directamente sobre las mutantes de VHL promoviendo su pérdida de función (Figura 62). Considerando los reportes que muestran los beneficios de incrementar la función de VHL en la evolución de los tumores (Ding et al., 2014; Iwamoto et al., 2015), intervenir sobre los niveles de RSUME surge como una alternativa a tener en cuenta para tumores asociados a la pérdida de función de VHL, así como una herramienta para favorecer la acción de VHL en otros tipos tumorales.

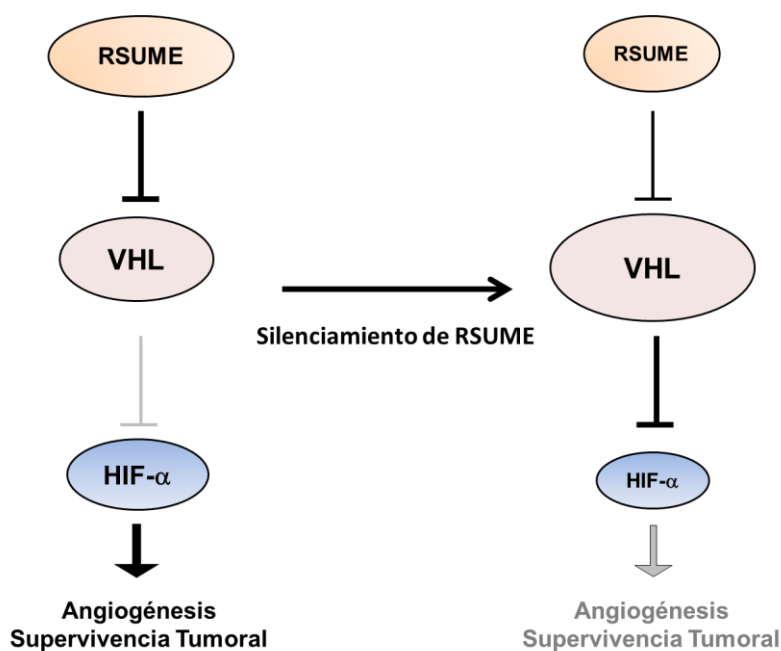


Figura 62: RSUME actúa negativamente sobre la función de VHL permitiendo el desarrollo tumoral. Niveles incrementados de RSUME modulan negativamente la función de VHL, generando un incremento desregulado de la actividad de HIF y con ello la vascularización anormal y supervivencia tumoral. Ante el silenciamiento de RSUME, VHL recupera funcionalidad, desestabilizando a HIF y con ello, impidiendo la angiogénesis y progresión tumoral.

Al utilizar las células RCC-786-O como modelo de síndrome de VHL, enfocamos nuestra investigación en los mecanismos que llevan a la carcinogénesis de los tumores renales. Sin embargo, cabe destacar que mutaciones en HIF-2 α que evitan su degradación por VHL llevan a la formación de otras neoplasias asociadas a la enfermedad VHL como Paragangliomas y Feocromocitomas. En particular, las mutantes de VHL del Tipo 2C, como es VHL_{L188V}, generan Feocromocitomas, tumores donde encontramos elevada expresión de RSUME (Gerez et al., 2015). Con los resultados obtenidos en los estudios mecanísticos, así como en los de angiogénesis y tumorigénesis, fue posible demostrar que RSUME impacta en la función de esta mutante del Tipo 2C. Sería de interés estudiar a RSUME en el contexto celular del Feocromocitoma, pero a la fecha no se han establecido líneas celulares de este tipo de tumor asociadas a la pérdida de VHL.

A lo largo de la presente Tesis, se ha descrito a RSUME como un modulador negativo de la función de VHL. RSUME se une a VHL, y por una vía independiente de la sumoilación, impacta sobre los complejos proteicos de VHL que permiten la ubiquitinación de HIF (Figura 61).

La descripción de este mecanismo cobra especial relevancia desde el punto en que se encontró expresión de RSUME en tumores asociados a la enfermedad VHL. Además, explicamos el mecanismo involucrado en la expresión patológica de RSUME, que

hace posible el establecimiento del fenotipo tumoral VHL. Las mutantes de VHL de Tipo 2 con función disminuida son incapaces de reducir los niveles de RSUME. Superado un umbral, RSUME impacta directamente sobre dichas mutantes y potencia la inestabilidad de los complejos de degradación de HIF, exacerbando la pérdida de función de las mutantes de VHL.

Esta Tesis es además, el primer reporte de que RSUME tiene un mecanismo de acción que va más allá de su rol como modulador positivo de la sumoilación. RSUME surge como un posible marcador de tumores asociados a la pérdida de función de VHL y es un factor pro-angiogénico y tumorigénico a ser tenido en cuenta a la hora de pensar estrategias para combatir, lo más ríto arriba posible en la cascada de señalización de HIF, el establecimiento de este tipo de tumores.

REFERENCIAS

Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M.A., Bunn, H.F., y Livingston, D.M. (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 12969-12973.

Bae, S.H., Jeong, J.W., Park, J.A., Kim, S.H., Bae, M.K., Choi, S.J., y Kim, K.W. (2004). Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications* 324, 394-400.

Baek, S.H., y Kim, K.I. (2016). Regulation of HIF-1alpha stability by lysine methylation. *BMB reports* 49, 245-246.

Baeriswyl, V., y Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in cancer biology* 19, 329-337.

Barata, P.C., Ornstein, M.C., y Garcia, J.A. (2017). The Evolving Treatment Landscape of Advanced Renal Cell Carcinoma in Patients Progressing after VEGF Inhibition. *Journal of kidney cancer and VHL* 4, 10-18.

Bernstock, J.D., Lee, Y.J., Peruzzotti-Jametti, L., Southall, N., Johnson, K.R., Maric, D., Volpe, G., Kouznetsova, J., Zheng, W., Pluchino, S., *et al.* (2016). A novel quantitative high-throughput screen identifies drugs that both activate SUMO conjugation via the inhibition of microRNAs 182 and 183 and facilitate neuroprotection in a model of oxygen and glucose deprivation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36, 426-441.

Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., y Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *The EMBO journal* 22, 4082-4090.

Berra, E., Richard, D.E., Gothie, E., y Pouyssegur, J. (2001). HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation. *FEBS letters* 491, 85-90.

Berta, M.A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J., y Brahimi-Horn, M.C. (2007). SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications* 360, 646-652.

Birnboim, H.C., y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Bracken, C.P., Whitelaw, M.L., y Peet, D.J. (2003). The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60, 1376-1393.

Brahimi-Horn, M.C., y Pouyssegur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS letters* 581, 3582-3591.

Brahimi-Horn, M.C., y Pouyssegur, J. (2009). HIF at a glance. *Journal of cell science* 122, 1055-1057.

Bratslavsky, G., Sudarshan, S., Neckers, L., y Linehan, W.M. (2007). Pseudohypoxic pathways in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 4667-4671.

Bruick, R.K. (2003). Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes & development* 17, 2614-2623.

Buckley, D.L., Van Molle, I., Gareiss, P.C., Tae, H.S., Michel, J., Noblin, D.J., Jorgensen, W.L., Ciulli, A., y Crews, C.M. (2012). Targeting the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1alpha interaction. *Journal of the American Chemical Society* 134, 4465-4468.

Cai, Q., y Robertson, E.S. (2010). Ubiquitin/SUMO modification regulates VHL protein stability and nucleocytoplasmic localization. *PloS one* 5.

Cai, Q., Verma, S.C., Kumar, P., Ma, M., y Robertson, E.S. (2010). Hypoxia inactivates the VHL tumor suppressor through PIASy-mediated SUMO modification. *PloS one* 5, e9720.

Calzada, M.J. (2010). Von Hippel-Lindau syndrome: molecular mechanisms of the disease. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 12, 160-165.

Carbia-Nagashima, A., Gerez, J., Perez-Castro, C., Paez-Pereda, M., Silberstein, S., Stalla, G.K., Holsboer, F., y Arzt, E. (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell* 131, 309-323.

Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3, 4-10.

Carmeliet, P., y Jain, R.K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews Drug discovery* 10, 417-427.

Carrero, P., Okamoto, K., Coumilleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., y Poellinger, L. (2000). Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Molecular and cellular biology* 20, 402-415.

Castro, C.P., Giacomini, D., Nagashima, A.C., Onofri, C., Graciarena, M., Kobayashi, K., Paez-Pereda, M., Renner, U., Stalla, G.K., y Arzt, E. (2003). Reduced expression of the cytokine transducer gp130 inhibits hormone secretion, cell growth, and tumor development of pituitary lactosomatotrophic GH3 cells. *Endocrinology* 144, 693-700.

Ciechanover, A., y Schwartz, A.L. (2004). The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochimica et biophysica acta* 1695, 3-17.

Cimarosti, H., Ashikaga, E., Jaafari, N., Dearden, L., Rubin, P., Wilkinson, K.A., y Henley, J.M. (2012). Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32, 17-22.

Clifford, S.C., Astuti, D., Hooper, L., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J., y Maher, E.R. (2001). The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis

of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1alpha in renal cell carcinoma. *Oncogene* 20, 5067-5074.

Coleman, M.L., y Ratcliffe, P.J. (2009). Angiogenesis: escape from hypoxia. *Nature medicine* 15, 491-493.

Crespigio, J., Berbel, L.C.L., Dias, M.A., Berbel, R.F., Pereira, S.S., Pignatelli, D., y Mazzuco, T.L. (2018). Von Hippel-Lindau disease: a single gene, several hereditary tumors. *Journal of endocrinological investigation* 41, 21-31.

Chan, J.Y., Tsai, C.Y., Wu, C.H., Li, F.C., Dai, K.Y., Sun, E.Y., Chan, S.H., y Chang, A.Y. (2011). Sumoylation of hypoxia-inducible factor-1alpha ameliorates failure of brain stem cardiovascular regulation in experimental brain death. *PLoS one* 6, e17375.

Chen, R., Dioum, E.M., Hogg, R.T., Gerard, R.D., y Garcia, J.A. (2011). Hypoxia increases sirtuin 1 expression in a hypoxia-inducible factor-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 286, 13869-13878.

Chen, W., Hill, H., Christie, A., Kim, M.S., Holloman, E., Pavia-Jimenez, A., Homayoun, F., Ma, Y., Patel, N., Yell, P., *et al.* (2016). Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. *Nature* 539, 112-117.

Chen, X., Kuang, W., Huang, H., Li, B., Zhu, Y., Zhou, B., y Yan, L. (2018). Knockdown of RWD domain containing 3 inhibits the malignant phenotypes of glioblastoma cells via inhibition of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling. *Experimental and therapeutic medicine* 16, 384-393.

Cheng, J., Kang, X., Zhang, S., y Yeh, E.T. (2007). SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* 131, 584-595.

Chien, W., Lee, K.L., Ding, L.W., Wuensche, P., Kato, H., Doan, N.B., Poellinger, L., Said, J.W., y Koeffler, H.P. (2013). PIAS4 is an activator of hypoxia signalling via VHL suppression during growth of pancreatic cancer cells. *British journal of cancer* 109, 1795-1804.

Chiocca, S. (2007). Viral control of the SUMO pathway: Gam1, a model system. *Biochemical Society transactions* 35, 1419-1421.

Chittiboina, P., y Lonser, R.R. (2015). Von Hippel-Lindau disease. *Handbook of clinical neurology* 132, 139-156.

Cho, H., Du, X., Rizzi, J.P., Liberzon, E., Chakraborty, A.A., Gao, W., Carvo, I., Signoretti, S., Bruick, R.K., Josey, J.A., *et al.* (2016). On-target efficacy of a HIF-2alpha antagonist in preclinical kidney cancer models. *Nature* 539, 107-111.

De Lella Ezcurra, A.L., Bertolin, A.P., Kim, K., Katz, M.J., Gandara, L., Misra, T., Luschnig, S., Perrimon, N., Melani, M., y Wappner, P. (2016). miR-190 Enhances HIF-Dependent Responses to Hypoxia in Drosophila by Inhibiting the Prolyl-4-hydroxylase Fatiga. *PLoS genetics* 12, e1006073.

Ding, Z., German, P., Bai, S., Reddy, A.S., Liu, X.D., Sun, M., Zhou, L., Chen, X., Zhao, X., Wu, C., *et al.* (2014). Genetic and pharmacological strategies to refunctionalize the von Hippel Lindau R167Q mutant protein. *Cancer research* 74, 3127-3136.

- Dioum, E.M., Chen, R., Alexander, M.S., Zhang, Q., Hogg, R.T., Gerard, R.D., y Garcia, J.A. (2009). Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science* 324, 1289-1293.
- Doerks, T., Copley, R.R., Schultz, J., Ponting, C.P., y Bork, P. (2002). Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome research* 12, 47-56.
- Druker, J., Liberman, A.C., Antunica-Noguerol, M., Gerez, J., Paez-Pereda, M., Rein, T., Iniguez-Lluhi, J.A., Holsboer, F., y Arzt, E. (2013). RSUME enhances glucocorticoid receptor SUMOylation and transcriptional activity. *Molecular and cellular biology* 33, 2116-2127.
- Duan, C. (2016). Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *American journal of physiology Cell physiology* 310, C260-269.
- Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de The, H., Hay, R.T., y Freemont, P.S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *Journal of cell science* 112 (Pt 3), 381-393.
- Edgell, C.J., Haizlip, J.E., Bagnell, C.R., Packerham, J.P., Harrison, P., Wilbourn, B., y Madden, V.J. (1990). Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 26, 1167-1172.
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., y 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. *The EMBO journal* 18, 1905-1914.
- Evans, D.G., Maher, E.R., Macleod, R., Davies, D.R., y Craufurd, D. (1997). Uptake of genetic testing for cancer predisposition. *Journal of medical genetics* 34, 746-748.
- FJ, O.B., Danapal, M., Jairam, S., Lalani, A.K., Cunningham, J., Morrin, M., McNally, S., Donovan, M.G., Little, D., Tuthill, A., *et al.* (2014). Manifestations of Von Hippel Lindau syndrome: a retrospective national review. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 107, 291-296.
- Folkman, J., y Hanahan, D. (1991). Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu symposia* 22, 339-347.
- Frantzen, C., Klasson, T.D., Links, T.P., y Giles, R.H. (1993). Von Hippel-Lindau Syndrome. In *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, y A. Amemiya, eds. (Seattle (WA)).
- Frew, I.J., y Krek, W. (2008). pVHL: a multipurpose adaptor protein. *Science signaling* 1, pe30.
- Fuertes, M., Sapochnik, M., Tedesco, L., Senin, S., Attorresi, A., Ajler, P., Carrizo, G., Cervio, A., Sevlever, G., Bonfiglio, J.J., *et al.* (2018). Protein stabilization by RSUME accounts for PTTG pituitary tumor abundance and oncogenicity. *Endocrine-related cancer* 25, 665-676.
- Galdeano, C., Gadd, M.S., Soares, P., Scaffidi, S., Van Molle, I., Birced, I., Hewitt, S., Dias, D.M., y Ciulli, A. (2014). Structure-guided design and optimization of small

molecules targeting the protein-protein interaction between the von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase and the hypoxia inducible factor (HIF) alpha subunit with in vitro nanomolar affinities. *Journal of medicinal chemistry* 57, 8657-8663.

Garcia-Donas, J., Rodriguez-Antona, C., y Jonasch, E. (2013). Molecular markers to predict response to therapy. *Seminars in oncology* 40, 444-458.

Geiss-Friedlander, R., y Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 947-956.

Gerez, J., Fuertes, M., Tedesco, L., Silberstein, S., Sevlever, G., Paez-Pereda, M., Holsboer, F., Turjanski, A.G., y Arzt, E. (2013). In silico structural and functional characterization of the RSUME splice variants. *PLoS one* 8, e57795.

Gerez, J., Tedesco, L., Bonfiglio, J.J., Fuertes, M., Barontini, M., Silberstein, S., Wu, Y., Renner, U., Paez-Pereda, M., Holsboer, F., *et al.* (2015). RSUME inhibits VHL and regulates its tumor suppressor function. *Oncogene* 34, 4855-4866.

Gnarra, J.R., Zhou, S., Merrill, M.J., Wagner, J.R., Krumm, A., Papavassiliou, E., Oldfield, E.H., Klausner, R.D., y Linehan, W.M. (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10589-10594.

Gossage, L., Eisen, T., y Maher, E.R. (2015). VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nature reviews Cancer* 15, 55-64.

Gossage, L., Pires, D.E., Olivera-Nappa, A., Asenjo, J., Bycroft, M., Blundell, T.L., y Eisen, T. (2014). An integrated computational approach can classify VHL missense mutations according to risk of clear cell renal carcinoma. *Human molecular genetics* 23, 5976-5988.

Haake, S.M., Weyandt, J.D., y Rathmell, W.K. (2016). Insights into the Genetic Basis of the Renal Cell Carcinomas from The Cancer Genome Atlas. *Molecular cancer research : MCR* 14, 589-598.

Hacker, K.E., Lee, C.M., y Rathmell, W.K. (2008). VHL type 2B mutations retain VBC complex form and function. *PLoS one* 3, e3801.

Haglund, K., Di Fiore, P.P., y Dikic, I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends in biochemical sciences* 28, 598-603.

Han, X., Wang, X.L., Li, Q., Dong, X.X., Zhang, J.S., y Yan, Q.C. (2015). HIF-1alpha SUMOylation affects the stability and transcriptional activity of HIF-1alpha in human lens epithelial cells. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 253, 1279-1290.

Han, Z.J., Feng, Y.H., Gu, B.H., Li, Y.M., y Chen, H. (2018). The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review). *International journal of oncology* 52, 1081-1094.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

- Hanahan, D., y Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hansen, W.J., Ohh, M., Moslehi, J., Kondo, K., Kaelin, W.G., y Welch, W.J. (2002). Diverse effects of mutations in exon II of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene on the interaction of pVHL with the cytosolic chaperonin and pVHL-dependent ubiquitin ligase activity. *Molecular and cellular biology* 22, 1947-1960.
- Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Molecular cell* 18, 1-12.
- He, W., Huang, L., Shen, X., Yang, Y., Wang, D., y Zhu, X. (2017). Relationship between RSUME and HIF-1 α /VEGF-A with invasion of pituitary adenoma. *Gene* 603, 54-60.
- Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., Ballschmieter, P., y Krek, W. (2003). Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nature cell biology* 5, 64-70.
- Hershko, A., y Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67, 425-479.
- Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Elkins, J.M., y Schofield, C.J. (2003). The role of iron and 2-oxoglutarate oxygenases in signalling. *Biochemical Society transactions* 31, 510-515.
- Hickey, M.M., y Simon, M.C. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Current topics in developmental biology* 76, 217-257.
- Hlushchuk, R., Makanya, A.N., y Djonov, V. (2011). Escape mechanisms after antiangiogenic treatment, or why are the tumors growing again? *The International journal of developmental biology* 55, 563-567.
- Ho, T.H., y Jonasch, E. (2014). Genetic kidney cancer syndromes. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 12, 1347-1355.
- Hockel, M., y Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute* 93, 266-276.
- Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458, 422-429.
- Hoffman, M.A., Ohh, M., Yang, H., Klco, J.M., Ivan, M., y Kaelin, W.G., Jr. (2001). von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Human molecular genetics* 10, 1019-1027.
- Hu, C.J., Wang, L.Y., Chodosh, L.A., Keith, B., y Simon, M.C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Molecular and cellular biology* 23, 9361-9374.
- Huang, C., Han, Y., Wang, Y., Sun, X., Yan, S., Yeh, E.T., Chen, Y., Cang, H., Li, H., Shi, G., *et al.* (2009). SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *The EMBO journal* 28, 2748-2762.
- Huang, C.C., Tu, S.H., Lien, H.H., Jeng, J.Y., Huang, C.S., Huang, C.J., Lai, L.C., y Chuang, E.Y. (2013). Concurrent gene signatures for han chinese breast cancers. *PloS one* 8, e76421.

Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S.M., y Lee, F.S. (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *The Journal of biological chemistry* 277, 39792-39800.

Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., y Bunn, H.F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7987-7992.

Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., y Kaelin, W.G., Jr. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nature medicine* 1, 822-826.

Iliopoulos, O., Levy, A.P., Jiang, C., Kaelin, W.G., Jr., y Goldberg, M.A. (1996). Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10595-10599.

Iwamoto, H., Nakamura, T., Koga, H., Izaguirre-Carbonell, J., Kamisuki, S., Sugawara, F., Abe, M., Iwabata, K., Ikezono, Y., Sakaue, T., *et al.* (2015). Inhibition of hypoxia-inducible factor via upregulation of von Hippel-Lindau protein induces "angiogenic switch off" in a hepatoma mouse model. *Molecular therapy oncolytics* 2, 15020.

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., y Kim, K.W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111, 709-720.

Ji, C.X., Fan, Y.H., Xu, F., Lv, S.G., Ye, M.H., Wu, M.J., Zhu, X.G., y Wu, L. (2018). MicroRNA-375 inhibits glioma cell proliferation and migration by downregulating RWDD3 in vitro. *Oncology reports* 39, 1825-1834.

Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R., y Semenza, G.L. (1997). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *The Journal of biological chemistry* 272, 19253-19260.

Jiang, Y., Wang, J., Tian, H., Li, G., Zhu, H., Liu, L., Hu, R., y Dai, A. (2015). Increased SUMO-1 expression in response to hypoxia: Interaction with HIF-1alpha in hypoxic pulmonary hypertension. *International journal of molecular medicine* 36, 271-281.

Jonasch, E., Futreal, P.A., Davis, I.J., Bailey, S.T., Kim, W.Y., Brugarolas, J., Giaccia, A.J., Kurban, G., Pause, A., Frydman, J., *et al.* (2012). State of the science: an update on renal cell carcinoma. *Molecular cancer research : MCR* 10, 859-880.

Juengel, E., Engler, J., Natsheh, I., Jones, J., Mickuckyte, A., Hudak, L., Jonas, D., y Blaheta, R.A. (2009). Combining the receptor tyrosine kinase inhibitor AEE788 and the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor RAD001 strongly inhibits adhesion and growth of renal cell carcinoma cells. *BMC cancer* 9, 161.

Jung, Y.S., Lee, S.J., Yoon, M.H., Ha, N.C., y Park, B.J. (2012). Estrogen receptor alpha is a novel target of the Von Hippel-Lindau protein and is responsible for the proliferation of VHL-deficient cells under hypoxic conditions. *Cell Cycle* 11, 4462-4473.

Kaelin, W.G., Jr. (2004). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 6290S-6295S.

- Kaelin, W.G., Jr. (2008). The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nature reviews Cancer* 8, 865-873.
- Kaelin, W.G., Jr. (2017). The VHL Tumor Suppressor Gene: Insights into Oxygen Sensing and Cancer. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 128, 298-307.
- Kaelin, W.G., Jr., y Maher, E.R. (1998). The VHL tumour-suppressor gene paradigm. *Trends in genetics : TIG* 14, 423-426.
- Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., y Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *The EMBO journal* 17, 6573-6586.
- Kang, X., Li, J., Zou, Y., Yi, J., Zhang, H., Cao, M., Yeh, E.T., y Cheng, J. (2010). PIASy stimulates HIF1alpha SUMOylation and negatively regulates HIF1alpha activity in response to hypoxia. *Oncogene* 29, 5568-5578.
- Keith, B., Johnson, R.S., y Simon, M.C. (2011). HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews Cancer* 12, 9-22.
- Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J.A., y Kaelin, W.G., Jr. (1995). Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* 269, 1444-1446.
- Kietzmann, T., Mennerich, D., y Dimova, E.Y. (2016). Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Frontiers in cell and developmental biology* 4, 11.
- Kim, W.Y., Safran, M., Buckley, M.R., Ebert, B.L., Glickman, J., Bosenberg, M., Regan, M., y Kaelin, W.G., Jr. (2006). Failure to prolyl hydroxylate hypoxia-inducible factor alpha phenocopies VHL inactivation in vivo. *The EMBO journal* 25, 4650-4662.
- Kivirikko, K.I., y Myllyharju, J. (1998). Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 16, 357-368.
- Knauth, K., Bex, C., Jemth, P., y Buchberger, A. (2006). Renal cell carcinoma risk in type 2 von Hippel-Lindau disease correlates with defects in pVHL stability and HIF-1alpha interactions. *Oncogene* 25, 370-377.
- Knauth, K., Cartwright, E., Freund, S., Bycroft, M., y Buchberger, A. (2009). VHL mutations linked to type 2C von Hippel-Lindau disease cause extensive structural perturbations in pVHL. *The Journal of biological chemistry* 284, 10514-10522.
- Koh, M.Y., Nguyen, V., Lemos, R., Jr., Darnay, B.G., Kiriakova, G., Abdelmelek, M., Ho, T.H., Karam, J., Monzon, F.A., Jonasch, E., *et al.* (2015). Hypoxia-induced SUMOylation of E3 ligase HAF determines specific activation of HIF2 in clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer research* 75, 316-329.
- Kondo, K., Kim, W.Y., Lechpammer, M., y Kaelin, W.G., Jr. (2003). Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS biology* 1, E83.
- Kondo, K., Kico, J., Nakamura, E., Lechpammer, M., y Kaelin, W.G., Jr. (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer cell* 1, 237-246.

- Kumar, V., y Gabrilovich, D.I. (2014). Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology* 143, 512-519.
- Lai, Y., Qiao, M., Song, M., Weintraub, S.T., y Shiio, Y. (2011a). Quantitative proteomics identifies the Myb-binding protein p160 as a novel target of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *PLoS one* 6, e16975.
- Lai, Y., Song, M., Hakala, K., Weintraub, S.T., y Shiio, Y. (2011b). Proteomic dissection of the von Hippel-Lindau (VHL) interactome. *Journal of proteome research* 10, 5175-5182.
- Lai, Y., Song, M., Hakala, K., Weintraub, S.T., y Shiio, Y. (2012). The interaction of the von Hippel-Lindau tumor suppressor and heterochromatin protein 1. *Archives of biochemistry and biophysics* 518, 103-110.
- Lancaster, D.E., McDonough, M.A., y Schofield, C.J. (2004). Factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) and other asparaginyl hydroxylases. *Biochemical Society transactions* 32, 943-945.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., y Bruick, R.K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development* 16, 1466-1471.
- Lau, K.W., Tian, Y.M., Raval, R.R., Ratcliffe, P.J., y Pugh, C.W. (2007). Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor- α in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms. *British journal of cancer* 96, 1284-1292.
- Lee, C.M., Hickey, M.M., Sanford, C.A., McGuire, C.G., Cowey, C.L., Simon, M.C., y Rathmell, W.K. (2009a). VHL Type 2B gene mutation moderates HIF dosage in vitro and in vivo. *Oncogene* 28, 1694-1705.
- Lee, Y.J., Bernstock, J.D., Nagaraja, N., Ko, B., y Hallenbeck, J.M. (2016). Global SUMOylation facilitates the multimodal neuroprotection afforded by quercetin against the deleterious effects of oxygen/glucose deprivation and the restoration of oxygen/glucose. *Journal of neurochemistry* 138, 101-116.
- Lee, Y.J., Castri, P., Bembry, J., Maric, D., Auh, S., y Hallenbeck, J.M. (2009b). SUMOylation participates in induction of ischemic tolerance. *Journal of neurochemistry* 109, 257-267.
- Lee, Y.J., Mou, Y., Maric, D., Klimanis, D., Auh, S., y Hallenbeck, J.M. (2011). Elevated global SUMOylation in Ubc9 transgenic mice protects their brains against focal cerebral ischemic damage. *PLoS one* 6, e25852.
- Leonardi, E., Murgia, A., y Tosatto, S.C. (2009). Adding structural information to the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor interaction network. *FEBS letters* 583, 3704-3710.
- Li, J., Xu, Y., Long, X.D., Wang, W., Jiao, H.K., Mei, Z., Yin, Q.Q., Ma, L.N., Zhou, A.W., Wang, L.S., *et al.* (2014). Cbx4 governs HIF-1 α to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity. *Cancer cell* 25, 118-131.
- Li, L., Zhang, L., Zhang, X., Yan, Q., Minamishima, Y.A., Olumi, A.F., Mao, M., Bartz, S., y Kaelin, W.G., Jr. (2007). Hypoxia-inducible factor linked to differential kidney cancer risk seen with type 2A and type 2B VHL mutations. *Molecular and cellular biology* 27, 5381-5392.

- Li, M., y Kim, W.Y. (2011). Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *Journal of cellular and molecular medicine* 15, 187-195.
- Lisy, K., y Peet, D.J. (2008). Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell death and differentiation* 15, 642-649.
- Livneh, I., Cohen-Kaplan, V., Cohen-Rosenzweig, C., Avni, N., y Ciechanover, A. (2016). The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell research* 26, 869-885.
- Loboda, A., Jozkowicz, A., y Dulak, J. (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Molecules and cells* 29, 435-442.
- Lolkema, M.P., Gervais, M.L., Snijckers, C.M., Hill, R.P., Giles, R.H., Voest, E.E., y Ohh, M. (2005). Tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein requires phosphorylation of the acidic domain. *The Journal of biological chemistry* 280, 22205-22211.
- Lonergan, K.M., Iliopoulos, O., Ohh, M., Kamura, T., Conaway, R.C., Conaway, J.W., y Kaelin, W.G., Jr. (1998). Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Molecular and cellular biology* 18, 732-741.
- Lub, S., Maes, K., Menu, E., De Bruyne, E., Vanderkerken, K., y Van Valckenborgh, E. (2016). Novel strategies to target the ubiquitin proteasome system in multiple myeloma. *Oncotarget* 7, 6521-6537.
- Lucas, X., Van Molle, I., y Ciulli, A. (2018). Surface Probing by Fragment-Based Screening and Computational Methods Identifies Ligandable Pockets on the von Hippel-Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase. *Journal of medicinal chemistry*.
- Maher, E.R., Neumann, H.P., y Richard, S. (2011). von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *European journal of human genetics : EJHG* 19, 617-623.
- Majmundar, A.J., Wong, W.J., y Simon, M.C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell* 40, 294-309.
- Marxsen, J.H., Stengel, P., Doege, K., Heikkinen, P., Jokilehto, T., Wagner, T., Jelkmann, W., Jaakkola, P., y Metzen, E. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases. *The Biochemical journal* 381, 761-767.
- 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., y Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.
- Mei, Z., Jiao, H., Wang, W., Li, J., Chen, G., y Xu, Y. (2014). Polycomb chromobox 4 enhances migration and pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma cell line MHCC97L. *Science China Life sciences* 57, 610-617.
- Metelo, A.M., Noonan, H., y Iliopoulos, O. (2015). HIF2a inhibitors for the treatment of VHL disease. *Oncotarget* 6, 23036-23037.

- Nameki, N., Yoneyama, M., Koshiba, S., Tochio, N., Inoue, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Harada, T., Saito, K., *et al.* (2004). Solution structure of the RWD domain of the mouse GCN2 protein. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13, 2089-2100.
- Neumann, H.P., y Bender, B.U. (1998). Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. *Journal of internal medicine* 243, 541-545.
- Nguyen, H.C., Yang, H., Fribourgh, J.L., Wolfe, L.S., y Xiong, Y. (2015). Insights into Cullin-RING E3 ubiquitin ligase recruitment: structure of the VHL-EloBC-Cul2 complex. *Structure* 23, 441-449.
- Nielsen, S.M., Rhodes, L., Blanco, I., Chung, W.K., Eng, C., Maher, E.R., Richard, S., y Giles, R.H. (2016). Von Hippel-Lindau Disease: Genetics and Role of Genetic Counseling in a Multiple Neoplasia Syndrome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34, 2172-2181.
- Nordstrom-O'Brien, M., van der Luijt, R.B., van Rooijen, E., van den Ouweland, A.M., Majoor-Krakauer, D.F., Lolkema, M.P., van Brussel, A., Voest, E.E., y Giles, R.H. (2010). Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Human mutation* 31, 521-537.
- Nowak-Sliwinska, P., Alitalo, K., Allen, E., Anisimov, A., Aplin, A.C., Auerbach, R., Augustin, H.G., Bates, D.O., van Beijnum, J.R., Bender, R.H.F., *et al.* (2018). Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*.
- Nunez-O'Mara, A., y Berra, E. (2013). Deciphering the emerging role of SUMO conjugation in the hypoxia-signaling cascade. *Biological chemistry* 394, 459-469.
- Ohh, M., y Kaelin, W.G., Jr. (2003). VHL and kidney cancer. *Methods Mol Biol* 222, 167-183.
- Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V., y Kaelin, W.G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nature cell biology* 2, 423-427.
- Ohh, M., Yauch, R.L., Lonergan, K.M., Whaley, J.M., Stemmer-Rachamimov, A.O., Louis, D.N., Gavin, B.J., Kley, N., Kaelin, W.G., Jr., y Iliopoulos, O. (1998). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Molecular cell* 1, 959-968.
- Ong, K.R., Woodward, E.R., Killick, P., Lim, C., Macdonald, F., y Maher, E.R. (2007). Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. *Human mutation* 28, 143-149.
- Papandreou, I., Powell, A., Lim, A.L., y Denko, N. (2005). Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment. *Mutation research* 569, 87-100.
- Patel, N.S., Muneer, A., Blick, C., Arya, M., y Harris, A.L. (2009). Targeting vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 30, 292-299.
- Patel, P.H., Chadalavada, R.S., Chaganti, R.S., y Motzer, R.J. (2006). Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 7215-7220.

- Pozzebon, M., Segre, C.V., y Chiocca, S. (2009). Inhibition of the SUMO pathway by Gam1. *Methods Mol Biol* 497, 285-301.
- Prabhakar, N.R., y Semenza, G.L. (2015). Oxygen Sensing and Homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 30, 340-348.
- Priesemann, M., Davies, K.M., Perry, L.A., Drake, W.M., Chew, S.L., Monson, J.P., Savage, M.O., y Johnston, L.B. (2006). Benefits of screening in von Hippel-Lindau disease--comparison of morbidity associated with initial tumours in affected parents and children. *Hormone research* 66, 1-5.
- Prowse, A.H., Webster, A.R., Richards, F.M., Richard, S., Olschwang, S., Resche, F., Affara, N.A., y Maher, E.R. (1997). Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. *American journal of human genetics* 60, 765-771.
- Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M., y Ratcliffe, P.J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *The Journal of biological chemistry* 272, 11205-11214.
- Rankin, E.B., Tomaszewski, J.E., y Haase, V.H. (2006). Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer research* 66, 2576-2583.
- Rathmell, W.K., Hickey, M.M., Bezman, N.A., Chmielecki, C.A., Carraway, N.C., y Simon, M.C. (2004). In vitro and in vivo models analyzing von Hippel-Lindau disease-specific mutations. *Cancer research* 64, 8595-8603.
- Rathmell, W.K., y Simon, M.C. (2005). VHL: oxygen sensing and vasculogenesis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3, 2627-2632.
- Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., y Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Molecular and cellular biology* 25, 5675-5686.
- Razafinjatovo, C., Bihl, S., Mischo, A., Vogl, U., Schmidinger, M., Moch, H., y Schraml, P. (2016). Characterization of VHL missense mutations in sporadic clear cell renal cell carcinoma: hotspots, affected binding domains, functional impact on pVHL and therapeutic relevance. *BMC cancer* 16, 638.
- Rechsteiner, M.P., von Teichman, A., Nowicka, A., Sulser, T., Schraml, P., y Moch, H. (2011). VHL gene mutations and their effects on hypoxia inducible factor HIFalpha: identification of potential driver and passenger mutations. *Cancer research* 71, 5500-5511.
- Rey, S., y Semenza, G.L. (2010). Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovascular research* 86, 236-242.
- Ricketts, C.J., De Cubas, A.A., Fan, H., Smith, C.C., Lang, M., Reznik, E., Bowlby, R., Gibb, E.A., Akbani, R., Beroukhi, R., *et al.* (2018). The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell reports* 23, 3698.
- Rodriguez, M.S., Dargemont, C., y Hay, R.T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *The Journal of biological chemistry* 276, 12654-12659.

- Ruas, J.L., Berchner-Pfannschmidt, U., Malik, S., Gradin, K., Fandrey, J., Roeder, R.G., Pereira, T., y Poellinger, L. (2010). Complex regulation of the transactivation function of hypoxia-inducible factor-1 alpha by direct interaction with two distinct domains of the CREB-binding protein/p300. *The Journal of biological chemistry* 285, 2601-2609.
- Samanta, D., Prabhakar, N.R., y Semenza, G.L. (2017). Systems biology of oxygen homeostasis. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine* 9.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schito, L., y Semenza, G.L. (2016). Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends in cancer* 2, 758-770.
- Schneider, B.P., Li, L., Radovich, M., Shen, F., Miller, K.D., Flockhart, D.A., Jiang, G., Vance, G., Gardner, L., Vatta, M., *et al.* (2015). Genome-Wide Association Studies for Taxane-Induced Peripheral Neuropathy in ECOG-5103 and ECOG-1199. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 5082-5091.
- Schofield, C.J., y Ratcliffe, P.J. (2005). Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochemical and biophysical research communications* 338, 617-626.
- Schulman, B.A. (2011). Twists and turns in ubiquitin-like protein conjugation cascades. *Protein science : a publication of the Protein Society* 20, 1941-1954.
- Semenza, G.L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Current opinion in genetics & development* 8, 588-594.
- Semenza, G.L. (1999). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual review of cell and developmental biology* 15, 551-578.
- Semenza, G.L. (2000). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes & development* 14, 1983-1991.
- Semenza, G.L. (2007). Life with oxygen. *Science* 318, 62-64.
- Semenza, G.L. (2009). Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* 24, 97-106.
- Semenza, G.L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29, 625-634.
- Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148, 399-408.
- Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P., y Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry* 271, 32529-32537.
- Semenza, G.L., y 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. *Molecular and cellular biology* 12, 5447-5454.

- Shan, B., Gerez, J., Haedo, M., Fuertes, M., Theodoropoulou, M., Buchfelder, M., Losa, M., Stalla, G.K., Arzt, E., y Renner, U. (2012). RSUME is implicated in HIF-1-induced VEGF-A production in pituitary tumour cells. *Endocrine-related cancer* 19, 13-27.
- Shao, R., Zhang, F.P., Tian, F., Anders Friberg, P., Wang, X., Sjoland, H., y Billig, H. (2004). Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS letters* 569, 293-300.
- Shmueli, M.D., Schnaider, L., Rosenblum, D., Herzog, G., Gazit, E., y Segal, D. (2013). Structural insights into the folding defects of oncogenic pVHL lead to correction of its function in vitro. *PLoS one* 8, e66333.
- Siemeister, G., Weindel, K., Mohrs, K., Barleon, B., Martiny-Baron, G., y Marme, D. (1996). Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer research* 56, 2299-2301.
- Simon, M.C. (2006). Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism* 3, 150-151.
- Sinha, S., Mondal, G., Hwang, E.J., Han da, W., Dutta, S.K., Iyer, S., Karumanchi, S.A., Kim, K.I., Couch, F.J., y Mukhopadhyay, D. (2011). Von Hippel-Lindau gene product directs cytokinesis: a new tumor suppressor function. *Journal of cell science* 124, 2132-2142.
- Soni, S., y Padwad, Y.S. (2017). HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncol* 56, 503-515.
- Stebbins, C.E., Kaelin, W.G., Jr., y Pavletich, N.P. (1999). Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 284, 455-461.
- Swatek, K.N., y Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell research* 26, 399-422.
- Tabaro, F., Minervini, G., Sundus, F., Quaglia, F., Leonardi, E., Piovesan, D., y Tosatto, S.C. (2016). VHLdb: A database of von Hippel-Lindau protein interactors and mutations. *Scientific reports* 6, 31128.
- Tandon, M., Wu, M., Begley, T.P., Myllyharju, J., Pirskanen, A., y Kivirikko, K. (1998). Substrate specificity of human prolyl-4-hydroxylase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 8, 1139-1144.
- Tarade, D., y Ohh, M. (2018). The HIF and other quandaries in VHL disease. *Oncogene* 37, 139-147.
- Thoma, C.R., Toso, A., Gutbrodt, K.L., Reggi, S.P., Frew, I.J., Schraml, P., Hergovich, A., Moch, H., Meraldi, P., y Krek, W. (2009). VHL loss causes spindle misorientation and chromosome instability. *Nature cell biology* 11, 994-1001.
- Tian, H., McKnight, S.L., y Russell, D.W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development* 11, 72-82.

- Toledo, R.A. (2017). New HIF2alpha inhibitors: potential implications as therapeutics for advanced pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocrine-related cancer* 24, C9-C19.
- Ulrich, H.D. (2007). SUMO teams up with ubiquitin to manage hypoxia. *Cell* 131, 446-447.
- van der Veen, A.G., y Ploegh, H.L. (2012). Ubiquitin-like proteins. *Annual review of biochemistry* 81, 323-357.
- van Hagen, M., Overmeer, R.M., Abolvardi, S.S., y Vertegaal, A.C. (2010). RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic acids research* 38, 1922-1931.
- Van Molle, I., Thomann, A., Buckley, D.L., So, E.C., Lang, S., Crews, C.M., y Ciulli, A. (2012). Dissecting fragment-based lead discovery at the von Hippel-Lindau protein: hypoxia inducible factor 1alpha protein-protein interface. *Chemistry & biology* 19, 1300-1312.
- Varshney, N., Kebede, A.A., Owusu-Dapaah, H., Lather, J., Kaushik, M., y Bhullar, J.S. (2017). A Review of Von Hippel-Lindau Syndrome. *Journal of kidney cancer and VHL* 4, 20-29.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., y Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5510-5514.
- Wang, Y., Chen, D.Q., Chen, M.Y., Ji, K.Y., Ma, D.X., y Zhou, L.F. (2017). Endothelial cells by inactivation of VHL gene direct angiogenesis, not vasculogenesis via Twist1 accumulation associated with hemangioblastoma neovascularization. *Scientific reports* 7, 5463.
- Wilding, A., Ingham, S.L., Laloo, F., Clancy, T., Huson, S.M., Moran, A., y Evans, D.G. (2012). Life expectancy in hereditary cancer predisposing diseases: an observational study. *Journal of medical genetics* 49, 264-269.
- Wilkinson, K.A., y Henley, J.M. (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *The Biochemical journal* 428, 133-145.
- Wizigmann-Voos, S., Breier, G., Risau, W., y Plate, K.H. (1995). Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer research* 55, 1358-1364.
- Wu, Y., Tedesco, L., Lucia, K., Schlitter, A.M., Garcia, J.M., Esposito, I., Auernhammer, C.J., Theodoropoulou, M., Arzt, E., Renner, U., *et al.* (2016). RSUME is implicated in tumorigenesis and metastasis of pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncotarget* 7, 57878-57893.
- Xiu, L., Jincheng, L., Chuhong, Z., Tian, H., Sai, L., Sha, H., Hanxing, Y., Yixi, T., Mingsheng, L., Meiling, W., *et al.* (2017). The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genes & Diseases* 4, 19-24.
- Yang, C., Huntoon, K., Ksendzovsky, A., Zhuang, Z., y Lonser, R.R. (2013). Proteostasis modulators prolong missense VHL protein activity and halt tumor progression. *Cell reports* 3, 52-59.

Yu, A.Y., Frid, M.G., Shimoda, L.A., Wiener, C.M., Stenmark, K., y Semenza, G.L. (1998). Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *The American journal of physiology* 275, L818-826.

Zecchin, A., Borgers, G., y Carmeliet, P. (2015). Endothelial cells and cancer cells: metabolic partners in crime? *Current opinion in hematology* 22, 234-242.

Zhang, J., y Zhang, Q. (2018). VHL and Hypoxia Signaling: Beyond HIF in Cancer. *Biomedicines* 6.

Zhang, Q., y Yang, H. (2012). The Roles of VHL-Dependent Ubiquitination in Signaling and Cancer. *Frontiers in oncology* 2, 35.

Zhang, S., Zhou, X., Wang, B., Zhang, K., Liu, S., Yue, K., Zhang, L., y Wang, X. (2014). Loss of VHL expression contributes to epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 50, 809-817.

Zhuang, Z., Frerich, J.M., Huntoon, K., Yang, C., Merrill, M.J., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Shively, S.B., Stamp, G., y Lonser, R.R. (2014). Tumor derived vasculogenesis in von Hippel-Lindau disease-associated tumors. *Scientific reports* 4, 4102.

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