



Estudio de la regulación de PHD1 y PHD3 por SUMO

Memoria presentada por Almudena Gerpe Pita, Licenciada en
Biología, para optar al título de Doctor

Directora:

Dra. Miren Edurne Berra Ramírez

Investigadora Principal, CIC bioGUNE

Tutor:

Dr. Arkaitz Carracedo Pérez

Profesor asociado de la UPV/EHU

**Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio “Fisiopatología de la cascada de señalización por hipoxia”
de CIC bioGUNE**

**El trabajo presentado en esta tesis ha sido posible gracias a la
financiación de las siguientes entidades:**

**BES-2011-047721
SAF-2010-20067
BFU-2013-46647-R**



HypO&iaNet

«Si quieres construir un barco, no empieces por
buscar madera, cortar tablas o distribuir el
trabajo. Evoca primero en los hombres y mujeres
el anhelo del mar libre y ancho»

- Antoine de Sant-Exupéry

«Es mucho más difícil juzgarse uno mismo que
juzgar a los demás. Si logras juzgarte
correctamente serás un verdadero sabio»

- Antoine de Sant-Exupéry

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Edurne Berra por aceptarme en su laboratorio y permitirme realizar la tesis doctoral.

A mis compañeras de laboratorio Amelie, Encarni, Onintza, Sara y Teresa y a los compañeros de laboratorio que se han ido, Bakarne, Pablo y Patricia; les agradezco su compañía en el día a día y la ayuda prestada a lo largo de estos años. Quiero agradecer especialmente a Analía el que me haya enseñado numerosas técnicas en mi primer año y su infinita paciencia a la hora de explicármelas.

A todos los compañeros de unidad Miriam, Irantzu, Itxaso, Eder, Oihana y So Young. Gracias a Giacomo y Nora por enseñarme tanto y estar siempre que los necesitaba.

A la gente de las demás unidades muy especialmente a Arkaitz, Patricia, Fede, Itziar, Mónica, las dos Amaias, Lucía y Félix, por ser buenos compañeros.

A miña familia política. A Jane, Belén e María. Por acollerme como una máis, sodes coma meus irmáns.

A Hermosinda, Pepe, Vicente e Pilar. Por todo o que nos axudastes e por tratarme ben.

A miña familia. A meus país, Ramón e Mari Carmen; a meu irmán Adrián; a miña tía Fina e a meus avós Antonio e Magdalena. Ós que xa non están, Cristina e Celestrino, sempre estades nos meus pensamentos. Por ensinarme a valorar as cousas verdadeiramente importantes. Por todo o que traballastes e por ensinarme a me esforzar. Grazas polo apoio nestes difíciles anos e por estar sempre que se vos precisa.

A Manu, por estar sempre ó meu carón e terme dado forzas. Sen ti non tería acabado esta tese. Polos bos momentos vividos nestes anos. Eres o meu gran apoio.

Las PHDs (*Prolyl-Hydroxylase Domain containing proteins*) catalizan la hidroxilación de proteínas diana y se identificaron inicialmente como sensores de oxígeno capaces de regular la estabilidad de la subunidad α del factor de transcripción HIF (*Hypoxia Inducible Factor*), implicado en la cascada de señalización de hipoxia y la homeostasis de oxígeno. Estas enzimas están altamente conservadas evolutivamente y se han descrito tres isoformas en mamíferos: PHD1, PHD2 y PHD3. Se trata, no obstante, de tres enzimas que exhiben funciones no redundantes. La existencia de vías de regulación propias podría explicar parte de estas especificidades.

La SUMOilación es un proceso semejante a la ubiquitinación que etiqueta covalentemente las proteínas diana con una pequeña molécula de 10 kDa denominada SUMO (*Small Ubiquitin related MOdifier*). Dicha modificación sucede de un modo secuencial, dinámico y es reversible por la acción de las deSUMOilasas. La SUMOilación modula diversas vías de señalización y entre ellas, la cascada de señalización de hipoxia. Estudios previos de nuestro laboratorio han identificado PHD1 y PHD3 como dianas de SUMO *in vitro*.

Este trabajo profundiza en la regulación de PHD1 y PHD3 por SUMO.

Los resultados indican que PHD1 es modificado *in cellulo* por SUMO sobre las lisinas 118/120 y 361. Dicha SUMOilación disminuye en condiciones de hipoxia y contribuye a la localización nuclear de PHD1 al inhibir su exporte al citoplasma. Los conjugados PHD1-SUMO no afectan la actividad transcripcional de HIF. Sin embargo, modulan los niveles de expresión de ciclina-D1 y ER α /PR favoreciendo la proliferación de células ER α (+). Además, PHD1-SUMO antagoniza el papel represor de PHD1 sobre la actividad de ATF4 inducida por hipoxia o taspigargina, sin afectar a la estabilidad de la proteína.

En cuanto a PHD3, nuestros datos indican que la SUMOilación de PHD3 reprime la actividad transcripcional de HIF-1, aunque no de HIF-2. Dicha represión está mediada por el NTAD de HIF-1 α , si bien este dominio resulta necesario pero no suficiente.

En conclusión, los resultados de este trabajo sugieren que la SUMOilación de PHD1 y PHD3 es esencial en la selección *vis a vis* de sus diferentes substratos.

PHDs (Prolyl-Hydroxylase Domain containing proteins) catalyze the hydroxylation of target proteins and were initially identified as the oxygen sensors that control the stability of the α subunit of Hypoxia Inducible Factor (HIF), which drives the hypoxia-signalling cascade and oxygen homeostasis. These enzymes are highly evolutionary conserved and three isoforms have been described in mammals: PHD1, PHD2 and PHD3. Nevertheless, the three enzymes exhibit non-redundant functions. We anticipated that particular regulatory pathways might explain such singularities.

SUMOylation, similar to ubiquitination, involves the covalent attachment of the 10 kDa Small Ubiquitin related Modifier (SUMO) to a target protein. This modification is sequential, dynamic and highly reversible process that modulates a number of signalling pathways including the hypoxia cascade. Previous data from our lab have shown that PHD1 and PHD3 are indeed *in vitro* SUMO targets.

Here, we have explored PHD1 and PHD3 regulation by SUMO.

Our results demonstrate that PHD1 is modified by SUMO *in cellulo* on three lysine residues (118/120 and 361). PHD1 SUMOylation decreases under hypoxia and contributes to the nuclear localization of PHD1 by inhibiting its export to the cytoplasm. PHD1-SUMO conjugates do not affect HIF transcriptional activity. However, they modulate the expression levels of cyclin-D1 and ER α /PR and promote ER α (+) cell proliferation. Furthermore, PHD1-SUMO antagonizes PHD1-mediated expression of hypoxia- and thapsigargin-induced ATF4 activation without affecting ATF4 stability.

Regarding PHD3, our data indicate that PHD3 SUMOylation represses HIF-1 but not HIF-2 transcriptional activity. Moreover, the NTAD of HIF-1 α is necessary but not sufficient to mediate such repression.

Taken together, our results suggest that PHD1- and PHD3- SUMOylation is a key regulatory mechanism to select among their specific targets.

I. Abreviaturas	23
II. Introducción	31
II.1. <i>Prolyl-Hydroxylase Domain containing Proteins</i> (PHDs).....	33
II.1.1. El O ₂ en la atmósfera y los sensores de O ₂	33
II.1.2. Descripción de las diferentes isoformas de las PHDs	35
II.1.3. Regulación de las PHDs	37
II.1.3.1. Regulación de la expresión	37
II.1.3.2. Regulación de la estabilidad	38
II.1.3.3. Regulación de la actividad catalítica	38
II.1.4. Dianas de las PHDs e implicaciones fisiopatológicas	40
II.1.4.1. <i>Hypoxia Inducible Factor</i> (HIF)	40
II.1.4.2. Otras dianas directas de las PHDs.....	44
II.1.4.3. Dianas plausibles cuya regulación depende de la actividad catalítica	45
II.1.4.4. Dianas que no dependen de la actividad catalítica	47
II.2. Las modificaciones post-traduccionales y los sensores de oxígeno: papel de SUMO	48
II.2.1. Cascada de SUMOilación	49
II.2.2. Consecuencias de la SUMOilación: relación con la cascada de señalización de hipoxia	55
III. Objetivos	59
IV. Materiales y Métodos	63
IV.1. Biología Molecular	65
IV.1.1. Construcciones	65
IV.1.2. Mutagénesis	66
IV.1.3. RT-qPCR	67
IV.2. Biología Celular	67
IV.2.1. Cultivos celulares y tratamientos	67
IV.2.2. Transfecciones	69
IV.2.3. Silenciamiento génico	69

IV.2.4. Preparación de los extractos	69
IV.2.5. Inmunofluorescencias	70
IV.2.6. <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (FRAP)	70
IV.3. Bioquímica.....	70
IV.3.1. Western Blot	70
IV.3.2. Ensayos Luciferasa	72
IV.3.3. Purificación por Resina de Níquel	72
IV.3.4. Inmunoprecipitación (IP)	73
IV.4. Análisis estadístico	74
V. Resultados	75
V.1. Estudio de la SUMOilación de PHD1	77
V.1.1. PHD1 es diana de SUMO	77
V.1.2. Identificación de los residuos SUMOilables de PHD1	78
V.1.3. Estudio del SIM de PHD1	82
V.1.4. Regulación de la SUMOilación de PHD1 por hipoxia	83
V.1.5. Impacto de la SUMOilación en la estabilidad de PHD1	86
V.1.6. Impacto de la SUMOilación en la localización de PHD1	87
V.1.7. Relevancia funcional de la SUMOilación de PHD1	95
V.1.7.1. PHD1-SUMO e HIF	95
V.1.7.2 PHD1-SUMO y NFκB	96
V.1.7.3. PHD1-SUMO y ciclina-D1, ERα y PR	97
V.1.7.4. PHD1-SUMO y ATF4 y mTORC1	99
V.2. Estudio de PHD3-SUMO y la actividad transactivadora de HIF	104
V.2.1. Impacto de PHD3-SUMO sobre HIF-1α y/o HIF-2α	104
V.2.2. Análisis de la región diana del efecto represor	108
V.2.3. Impacto de la SUMOilación en la interacción con HIF-1α	109

VI. Discusión	111
VI.1. PHD1 como sustrato de SUMO	113
VI.2. Consecuencias de la SUMOilación de PHD1	114
V.2.1 PHD1-SUMO y su localización nuclear	114
V.2.2 Consecuencias de la SUMOilación de PHD1 sobre sus dianas	115
V.2.2.1. Ciclina-D1 y ER α /PR	116
V.2.2.2. ATF4	116
VI.3. Consecuencias de la SUMOilación de PHD3	117
VI.4. Modulación de la SUMOilación de PHD1 y PHD3 por hipoxia	118
VI.5. Relevancia fisiológica y/o patológica de la SUMOilación de PHD1 y PHD3	119
VII. Conclusiones	123
VIII. Bibliografía	127
IX. Anexo	162

I. Abreviaturas

Aquellas palabras cuya sigla no corresponda con las palabras que la definan en castellano, se definirán en inglés.

2-OG: 2-oxoglutarato

3D: tridimensional

3,4 DHB: 3,4-dihidroxibenzoato

ADM: adrenomodulina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AEBSF: *4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride*

AKAP12: *A-kinase anchor protein 12*

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

AOS1: *SUMO-activating enzyme subunit 1*

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNT: *aryl hydrocarbon nuclear translocator*

ASNS: *asparagine synthetase*

ATF4: *activating transcription factor 4*

ATP: adenosín-5'-trifosfato

ATR: *ataxia telangiectasia and rad3-related protein*

Bax: *bcl-2-like protein 4*

Bcl-2: *B-cell lymphoma-2*

Bcl-xL: *B-cell lymphoma-extra large*

b-HLH: *basic-helix loop helix*

BLM: *bloom syndrome protein*

bZIP: *basic región/leucine zipper*

CA9: *carbonic anhidrase 9*

CaMKII: *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*

CAT-1: *calcium transport protein-1*

CBP: *creb-binding protein*

CBX4: *cromobox homolog 4*

CD24/44: *cluster of differentiation 24/44*

CDK: *cyclin dependent kinase*

CENP-F: *centromere protein F*

Cep192: *centrosomal protein 192*

Chk1: *checkpoint kinase 1*
CHOP: *C/EBP homologous protein*
CHX: *cicloheximida*
ciAP: *cellular inhibitor of apoptosis-1*
CREB: *cAMP response element-binding protein*
CSCs: *Cancer Stem Cells*
CTAD: *C-terminal Transactivation Domain*
CtBP1: *Carboxyl-terminus Binding Protein 1*
CUL2: *culina 2*
DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*
DAXX: *death domain-associated protein 6*
DeSI-1: *deSUMOylatin isopeptidase 1*
DMEM: *dulbecco's modified eagle's medium*
DMOG: *dimetilolaxilglicina*
DTT: *ditiotreititol*
ECL: *enhanced chemiluminescence buffer*
eEF2: *eukaryotic elongation factor 2*
EGFR: *epidermal growth factor receptor*
EGLN: *egg laying nine*
EPS15: *epidermal growth factor pathway substrate 15*
ErbB4: *Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4*
EPO: *eritropoyetina*
ER: *estrogen receptor*
ERE: *estrés de retículo endoplásmico*
EtBr: *ethidium bromide*
FBS: *fetal bovine serum*
FDXR: *ferridoxin reductase*
FIH: *factor inhibiting HIF*
FH: *fumarato hidratasa*
FIAT: *factor-inhibiting ATF4-mediated transcription*
FKBP38: *FK506-binding protein 8*
FOXO3: *forkhead box O3*
FRAP: *fluorescence recovery after photobleaching*
GFP: *green fluorescent protein*
GLUT1/4: *glucose transporter 1/4*

GRB2: *growth factor receptor bound protein 2*

GTPasa: *guanosina trifosfatasa*

HA: *influenza hemagglutinin*

HCLK2: *human CDC-like kinase 2*

HDAC4: *histone deacetylase 4*

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HIF: *hypoxia inducible factor*

HLH: *helix-loop-helix*

HO1: *heme oxygenase 1*

HPH: *HIF prolyl hydroxilase*

hPRP19: *human precursor rna processing 19*

HRE: *hypoxia response element*

HSP90: *heat shock protein 90*

ICP0: *infected cell polypeptide 0*

ID: *inhibitory domain*

(IDH)1/2: *isocitrate dehydrogenase 1/2*

IKK β : *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase β*

IP: *inmunoprecipitación*

ISR: *integrated stress response*

JAK: *janus kinase*

KIF1B β : *kinesin-like protein KIF1B*

K_m: *constante de Michaelis-Menten*

LMB: *leptomicina-B*

L-Mim: *L-mimosina*

LIMD1: *LIM domain containing protein 1*

MCF7: *Michigan Cancer Foundation-7*

MEF: *mouse embryo fibroblast*

MEF2: *myocyte enhancer factor 2*

MEK: *mitogen-activated protein kinase kinase*

MORG1: *map organizer 1*

mTORC: *mammalian target of rapamycin complex 1*

NCOR2: *nuclear receptor corepressor 2*

NDSM: *negatively charged amino acid-dependent sumoylation motif*

NES: *nuclear export signal*

NF κ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NGF: *nerve growth factor*
NLS: *nuclear localization signal*
NM: *no modificado*
NO: *nitric oxide*
NRF: *respiratory nuclear factor*
NTAD: *N-terminal transactivation domain*
ODDD: *oxygen dependent degradation domain*
OGD: *oxygen and glucose deprivation*
OS-9: *osteosarcoma precursor 9*
P4HD: *protein 4 hydroxylase domain*
p53: *protein 53*
p300: *histone acetyltransferase p300*
PAS: *per-arnt-sim*
Pax2: *paired box 2*
PBS: *phosphate buffered saline*
Pc2: *polycomb 2 homologue*
PCBP1/PCBP2: *poly(rC)-binding protein 1/2*
PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*
PCR: *polymerase chain reaction*
PDE4D: *phosphodiesterase 4D*
PDGF: *platelet-derived growth factor*
PDSM: *phosphorylation-dependent SUMOylation motif*
PDH: *pyruvate deshydrogenase*
PDK1/4: *pyruvate dehydrogenase kinase 1/4*
PGC1 α : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
PH4D: *prolyl 4 hydroxylase domain*
PHD: *prolyl hydroxylase domain containing protein*
PIAS: *protein inhibitor of the activated STAT*
PKM2: *pyruvate kinase subtype M2*
PML: *promyelocytic leukemia body*
PMT: *photon multiplier tube*
PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptor*
PR: *progesteron receptor*
PRC1: *polycomb repressive complex 1*
PTMs: *post-traslational modifications*

PVDF: *polyvinylidene fluoride membrane*
pVHL: *von hippel-lindau tumor suppressor*
qPCR: *quantitative PCR*
RAD52: *DNA repair and recombination protein*
Rag: *recombination-activation gene*
Ran: *ras-related nuclear protein*
RanGAP1: *ran GTPase-activating protein 1*
RanBP2: *ran binding protein 2*
Rbx: *RING box protein*
RE: *retículo endoplásmico*
RIP1: *receptor-interactin protein 1*
RNA: *ribonucleic acid*
ROS: *reactive oxygen species*
RPA: *replication protein A*
Rplp0: *ribosomal protein large P0*
RPM: *revolutions per minute*
RT: *room temperature*
RT-qPCR: *quantitative reverse transcription PCR*
RUNX2: *run related transcription factor 2*
S6: *proteína S6*
S6K: *S6 quinase*
SAE1/2: *SUMO activating enzyme 1/2*
SDH: *succinate dehydrogenase*
SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
SEM: *standard error of the mean*
SENP: *sentrin specific protease*
SGS1: *small growth suppressor 1*
shARN: *short hairpin ARN*
SIAH1/2: *seven in absentia homolog 1/2*
SIM: *SUMO interaction motif*
SKP1: *S-phase kinase associated protein 1*
SM-20: *smooth muscle-20*
SMAD4: *Drosophila mother against decapentaplegic 4*
SMT3: *suppressor of mif two 3*
SP100: *speckled 100 kDa*

SP-RING: *Siz/PIAS-really Interesting new gene*

STAT: *signal transducer and activator of transcription*

STUbL: *SUMO-targeted ubiquitin ligase*

SUMO: *small ubiquitin related modifier*

TAD: *transactivation domain*

TNF α : *tumor necrosis factor α*

TN: *tris-HCl, NaCl buffer*

TNT: *tris-HCl, NaCl, triton buffer*

TOPORS: *topoisomerase I-binding RING finger protein*

TR- α : *thyroid hormone- α*

TRB3: *tribbles homolog 3*

TRiC: *TCP-1 ring complex*

TRPA1: *transient receptor potential cation channel A1*

tSIM-UIMs: *SUMO- and ubiquitin-interacting motifs*

UBA2: *SUMO-activating enzyme subunit 2*

UBC9: *ubiquitin carrier protein 9*

UBL: *ubiquitin like proteins*

Ulp1/2: *ubiquitin-like-specific protease 1/2*

UPR: *unfolded protein response*

USF2: *upstream transcription factor 2*

USP9x: *ubiquitin-specific peptidase 9, x-linked*

USP25: *ubiquitin-specific protease 25*

USPL1: *ubiquitin-specific protease-like 1*

UV: *ultravioleta*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

WB: *western blot*

Wss1: *weak suppressor of a temperature sensitive smt3-331 allele*

WT: *wild type*

XBP1: *X box binding protein-1*

XRCC4: *X-ray cross-complementation group 4*

YKU70: *ATP-dependent DNA helicase II subunit 1*

Zf-MYND: *myeloid nervy and DEAF-1 zinc-finger domain*

II. Introducción

II.1 Prolyl-Hydroxylase Domain Containing proteins (PHDs)

II.1.1 El O₂ en la atmósfera y los sensores de O₂

Las *Prolyl-Hydroxylase Domain containing proteins* (PHDs) (también denominadas *EGg-Laying abnormal Nine*, EGLN, o *HIF Prolyl Hydroxylases*, HPHs) pertenecen a la superfamilia de dioxigenasas dependientes de hierro y 2-oxoglutarato (2-OG). Esta superfamilia incluye a las prolil- y lisil-hidroxilasas del colágeno, las ADN demetiladas, demetiladas que contienen histonas y la asparaginil hidroxilasa *Factor Inhibiting HIF* (FIH) (Aravind y Koonin, 2001; Klose et al., 2006; Pollard et al., 2008; Taylor, 2001).

Las PHDs emplean el oxígeno (O₂) y 2-oxoglutarato como co-substratos y Fe⁺² y ascorbato como co-factores (Figura II.1.1.1). Un átomo de oxígeno es añadido a una prolina substrato generándose 4-hidroxiprolina en la reacción de hidroxilación, mientras que el otro átomo de oxígeno se acopla, en una reacción de descarboxilación, sobre el 2-oxoglutarato generándose succinato y dióxido de carbono. El Fe⁺² actúa como andamiaje en la unión de los reactantes al sitio activo de la enzima y el ascorbato es necesario para su re-activación, reduciendo el Fe⁺³ resultante de la reacción de descarboxilación (Valegard et al., 1998).

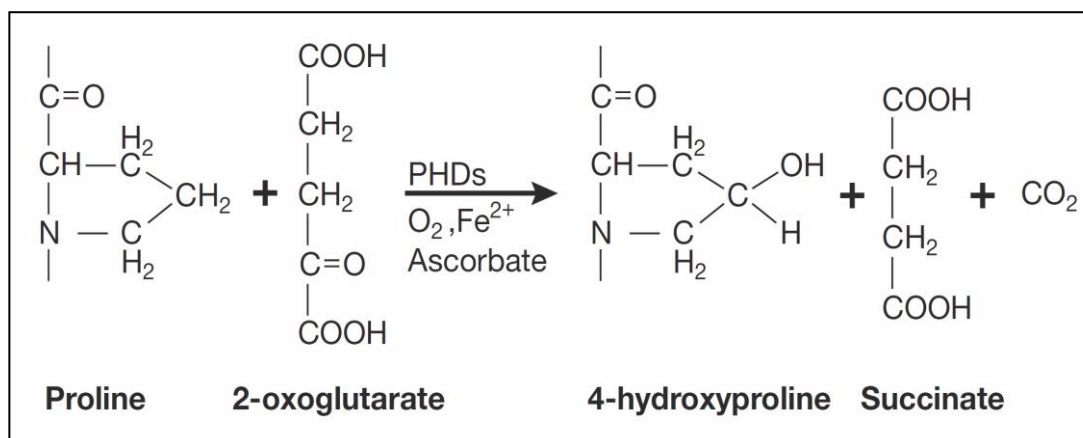


Figura II.1.1.1. Reacción catalizada por las PHDs. Estas enzimas necesitan O₂ y 2-OG como co-substratos y Fe²⁺ y ascorbato como co-factores. La reacción de hidroxilación genera 4-hidroxiprolina, succinato y CO₂. Adaptado de Berra et al (2006).

Las PHDs surgieron como respuesta a la acumulación de O₂ en la atmósfera terrestre como consecuencia de la aparición de las cianobacterias fotosintéticas hace 2,5 millones de años. Este cambio fue mortal para la mayor parte de los organismos unicelulares anaerobios debido a la elevada reactividad y toxicidad del oxígeno (Semenza, 2007). El oxígeno constituyó, sin embargo, un verdadero impulsor de adaptación evolutiva. Como consecuencia de dicha adaptación se desarrollaron organismos más complejos

con sistemas antioxidantes capaces de acoplar la energía química del oxígeno a la producción de ATP (Dole, 1965; Hedges, 2009). Así, el oxígeno se convirtió en un elemento vital para la mayor parte de los organismos y por ello, desarrollaron sofisticados mecanismos para garantizar la homeostasis del oxígeno (Rich, 2003). Dichos mecanismos son capaces de responder a un déficit de oxígeno (hipoxia) producido por un incremento en la demanda de O₂ o un suministro insuficiente. En metazoos, la ruta de señalización que coordina esta respuesta es la **cascada de señalización activada por hipoxia**, cuyo modulador principal es el factor de transcripción **Hypoxia Inducible Factor (HIF)** (Semenza y Wang, 1992; Wang et al., 1995). La evolución de la familia de las PHDs está íntimamente ligada a esta cascada y a los niveles de oxígeno atmosférico.

La familia de las PHDs está muy conservada a nivel evolutivo y muestra una creciente complejidad como se demuestra por la presencia de tres isoformas en mamíferos (**PHD1, 2 y 3/EGLN2, 1 y 3**) frente a una única isoforma en invertebrados (Figura II.1.1.2). Es de subrayar la ausencia de la familia EGLN en arqueas, levaduras, plantas y virus, aunque se ha descrito una hidroxilasa similar en la ameba *Dictyostelium*, **P4H1**, que hidroxila Skp1, un homólogo de la E3 ubiquitina-ligasa F-BOX (van der Wel et al., 2005). Su presencia en bacterias es discontinua pero se han descrito genes que podrían codificar proteínas de la familia EGLN en *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* (Aravind and Koonin, 2001).

Avanzando en el árbol genealógico, nos encontramos con **egl-9**, la isoforma presente en *Caenorhabditis elegans* que fue, de hecho, la primera PHD identificada (Trent et al., 1983). Parece que en su origen, los ortólogos de las PHDs estaban ligadas a virulencia y/o patógenos. De hecho, Egl-9 es una diana de una toxina difusible producida por algunas cepas de *P. aeruginosa* que induce parálisis neuromuscular (Darby et al., 1999). El ortólogo en *Drosophila melanogaster* se denomina **Fatiga** (Acevedo et al., 2010).

La forma ancestral se caracteriza por la presencia de un dominio en forma de dedo de zinc de tipo *Myeloid Nervy and DEAF-1 (zf-MYND)* que está conservado únicamente en la isoforma **PHD2** de mamíferos. Dicha isoforma está presente en protistas, nematodos y artrópodos y muestra un 40% de identidad con Egl-9 (Epstein et al., 2001; Taylor, 2001). La aparición de PHD2 hace 800 millones de años coincide, además, con la del factor de transcripción HIF. Fue muy probablemente en este momento cuando los sensores de O₂ (PHDs) integraron la habilidad de regular una respuesta sistémica en respuesta a cambios en la disponibilidad de O₂.

Coincidiendo con un incremento de O₂ en la atmósfera de entorno al 23% (hace 460-421 millones de años) surgió por duplicación génica **PHD3**, presente en anfibios y peces además de en mamíferos. Finalmente, **PHD1**, exclusivo de mamíferos, surgió por una nueva duplicación génica después de la división de mamíferos y aves/reptiles hace unos 300 millones de años, momento en el que se registraron los picos más elevados en los niveles de oxígeno en la atmósfera (32%).

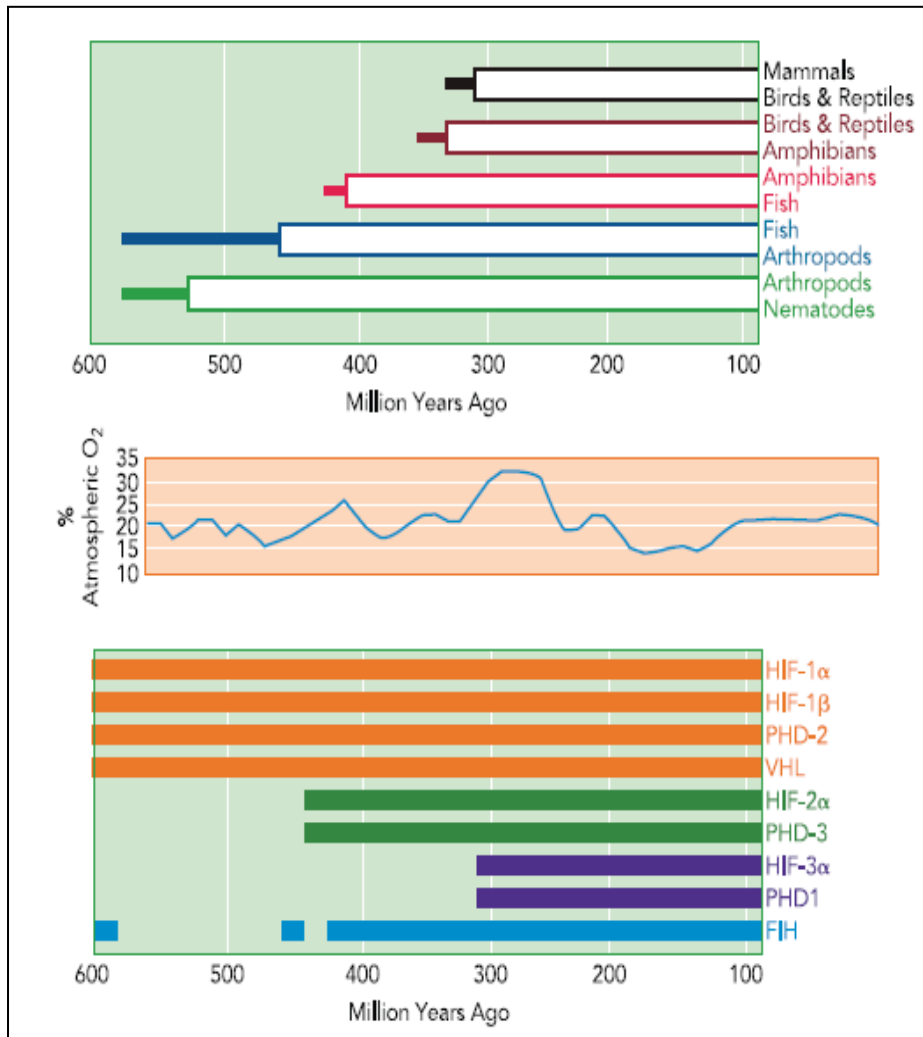


Figura II.1.1.2. Correlación de la evolución de los metazoos, los niveles de oxígeno y la cascada de señalización de hipoxia durante el eón Fanerozoico. Panel superior: Divergencias de los Filos indicados. Panel medio: Concentración de oxígeno atmosférico durante el Fanerozoico. Panel inferior: Período de aparición aproximado de los genes que codifican para los componentes de la cascada de señalización de hipoxia. Adaptado de Cormac y McElwain (2010).

II.1.2 Descripción de las diferentes isoformas de las PHDs

PHD1 (de 407 aminoácidos) es codificada en el genoma humano por el gen *EGLN2* que se localiza en el cromosoma 19q13.2 (Taylor, 2001). El gen *EGLN1* se sitúa en el cromosoma 1q42.1 y codifica la proteína PHD2, de 426 aminoácidos (Dupuy et al., 2000). Finalmente, *EGLN3*, ubicado en el cromosoma 14q13.1, codifica una proteína de 239 aminoácidos (Taylor, 2001).

PHD1 existe como dos especies distintas: PHD1p43 y PHD1p40 que se generan al iniciarse la traducción en un codón de iniciación alternativo, a nivel del aminoácido 34. Ambas variantes se localizan en el núcleo y

no muestran diferencias en su actividad catalítica aunque p43 es más estable que p40 (Tian et al., 2006). Los ARNm de PHD2 y PHD3 están sujetos a un proceso de corte y empalme alternativo. En el caso de PHD2 se han descrito dos variantes que carecen del exón 3 (PHD2Δ3) y 4 (PHD2Δ4), respectivamente. Ambas variantes se expresan de manera más débil que la forma de longitud completa y carecen de actividad catalítica (Hirsilä et al., 2003). De las tres variantes de corte y empalme de PHD3 descritas, se sabe que PHD3Δ1 carece del exón 1 y de actividad catalítica, mientras que PHD3Δ4 carece del exón 4 pero retiene su actividad hidroxilasa (Cervera et al., 2006).

La estructura proteica de las PHDs se caracteriza por la presencia, en el extremo C-terminal de la proteína, del dominio dioxigenasa denominado *Protein 4 Hydroxylase Domain* (P4HD) (Figura II.1.2). McDonough y colaboradores (2006) cristalizaron el dominio P4HD de PHD2 y su estructura muestra un plegamiento correspondiente a ocho hojas β plegadas en un barril *jelly roll*. Esta estructura alberga un motivo -H-X-D...-H- que contiene dos residuos histidinas y uno aspártico de unión del Fe^{2+} . Una arginina situada en posición +9 con respecto a la segunda histidina es responsable de la unión del 2-oxoglutarato.

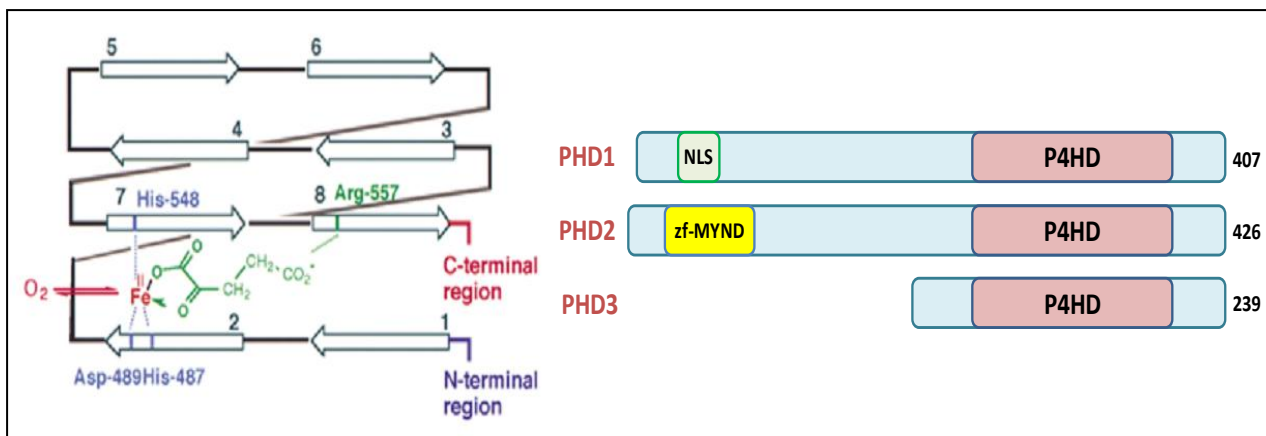


Figura II.1.2. Esquema representativo de la estructura de las PHDs. Representación del barril *jelly roll* de las PHDs constituido por 8 hojas β plegadas. Se muestra el lugar de unión del hierro (His-487, Asp-489 e His-548) y del 2-OG (Arg-557). Se muestra también un esquema de las PHDs. En verde, amarillo y rojo se muestran la NLS, el dominio zf-MYND y el dominio P4HD, respectivamente. Adaptado de Epstein et al (2001).

PHD1 y PHD2 presentan un extremo N-terminal divergente y cuya función no se conoce en detalle aunque se ha sugerido que dichos extremos son importantes en la determinación de la diversidad funcional de las PHDs (Figura II.1.2) (Epstein et al., 2001). Además, en el caso de PHD2, diversos estudios apuntan a que el dominio zf-MYND promueve su actividad hidroxilasa y/o regula su estabilidad (Barth et al., 2007; Ozer et al., 2005; To et al., 2005).

Las tres isoformas de PHD se expresan a nivel de ARNm y de proteína en múltiples tejidos pero difieren en cuanto a su abundancia relativa. PHD2 se expresa de manera uniforme aunque tiene una ligera

preferencia por el corazón, el riñón y el músculo esquelético. Por su parte, PHD1 se expresa mayoritariamente en el testículo y en la placenta. PHD3 es más abundante en el corazón, tejido adiposo, músculo esquelético y placenta (Cioffi et al., 2003; Lieb et al., 2002; Willam et al., 2006).

Las PHDs muestran un patrón de localización subcelular particular. Metzen y colaboradores (2003) determinaron, empleando proteínas fusionadas a GFP, que PHD1 se localiza exclusivamente en el núcleo; PHD2, mayormente en el citoplasma; y PHD3, en ambos compartimentos. PHD1 presenta una señal de localización nuclear bipartida (Steinhoff et al., 2009; Yasumoto et al., 2009). Por otro lado, PHD2 contiene una señal de exporte nuclear (NES por sus siglas en inglés) que regula el transporte entre núcleo y citoplasma (Steinhoff et al., 2009; Yasumoto et al., 2009). Finalmente, PHD3 se distribuye en el núcleo y el citoplasma aunque parece que la localización subcelular de PHD3 no afecta a su función (Jokilehto et al., 2010; Pientka et al., 2012).

Los embriones de ratones *knockout* para *Phd2* mueren entre los estadios 12,5 y 14,5 de desarrollo embrionario como consecuencia de anomalías en la placenta, desarrollo deficiente de miocardio y las trabéculas del corazón (Takeda et al., 2006). Por el contrario, ratones *Phd1*^{-/-} y *Phd3*^{-/-} pueden sobrevivir hasta la edad adulta aunque son varios los fenotipos asociados con dichas invalidaciones génicas (Aragón et al., 2008; Bishop et al., 2008; ver apartado II.1.4.1).

II.1.3 Regulación de las PHDs

II.1.3.1 Regulación de la expresión

La presencia de elementos de respuesta a hipoxia (HREs por sus siglas en inglés) en las secuencias reguladoras de los genes *EGLN1* y *EGLN3*, aunque no en el gen *EGLN2*, permite su inducción transcripcional por la acción de HIF (Aprelikova et al., 2004; Berra et al., 2003; Berra et al., 2001; Pescador et al., 2005).

Independientemente de hipoxia, la expresión del gen *EGLN2* es inducida por **estrógenos** (Appelhoff et al., 2004; Seth et al., 2002). Se han descrito varios inductores de *EGLN1* en rata, donde recibe el nombre de *Smooth Muscle-20* (*Sm-20*). En fibroblastos y neuronas, *Sm-20* es inducido por **p53** y la retirada del factor de crecimiento del nervio (**NGF** por sus siglas en inglés), respectivamente (Lipscomb et al., 1999; Lipscomb et al., 2001; Madden et al., 1996). En el músculo liso, en cambio, *Sm-20* es inducido por el *Platelet-Derived Growth Factor* (**PDGF**) y la **angiotensina II** (Lipscomb et al., 2001; Wax et al., 1994). Además, **c-Myc** y el **suero** (Kyo et al., 2000; Menzies et al., 2004) inducen *Sm-20* gracias a la presencia, en su promotor, de un lugar de unión SP1/SP3. Entre los inductores del ARNm de *Sm-20* se encuentran además la **forscolina**, el **isoprotenerol**, y la **cicloheximida** (Guyton et al., 1986; Wax et al., 1994). Por último, en células endoteliales, PHD3 es inducido por **interferón-γ** vía JAK/STAT (Gerber et al., 2009).

La expresión de *EGLN3* se reduce debido a la hiper-metilación en las **islas de CpG** presentes en el promotor de su gen en neoplasias de células B y en diferentes líneas celulares derivadas de melanoma, próstata, carcinoma de mama y riñón y cáncer colorrectal (Hatzimichael et al., 2010; Huang et al., 2010; Place et al., 2011; Rawluszko et al., 2013). Con respecto a *EGLN2* y *EGLN1*, los datos relativos a su regulación por metilación son contradictorios.

II.1.3.2 Regulación de la estabilidad

La estabilidad de PHD1 y PHD3, aunque no la de PHD2, es modulada por *Seven in absentia homolog 1 y 2* (**Siah1 y Siah2**). Estas E3 ubiquitina-ligasas son capaces de poli-ubiquitinar PHD1 y PHD3 lo que conlleva su degradación en el proteasoma (Nakayama et al., 2004). No obstante, aunque Siah1/2 son fuertemente inducidos en hipoxia, los niveles de expresión de PHD3 incrementan considerablemente. Y es que en normoxia, PHD3 forma homo-multímeros y agregados citosólicos de bajo peso molecular enzimáticamente activos y accesibles a Siah1/2, limitando la disponibilidad de la forma más activa de PHD3 (Rantanen et al., 2013). En hipoxia, sin embargo, PHD3 forma hetero-multímeros junto con PHD1 y PHD2. Éstos, son menos activos, de mayor peso molecular e inaccesibles para su degradación por Siah1/2 (Nakayama et al., 2007).

Por otra parte, la peptidil prolil cis/trans isomerasa **FKBP38** es capaz de unirse a PHD2 a través del dominio zf-MYND mediando su degradación por el proteasoma independiente de ubiquitinación (Barth et al., 2007).

II.1.3.3 Regulación de la actividad catalítica

Disponibilidad de oxígeno: Las PHDs requieren **oxígeno** para ser activas y los valores de sus K_m por el O_2 se sitúan en torno a 100-250 μ M. Este valor está por encima de la concentración del oxígeno en soluciones acuosas (10-30 μ M) y permite que cambios pequeños en la concentración de oxígeno influyan significativamente en la actividad catalítica de estas enzimas (Hirsilä et al., 2003), tal y como corresponde a un «sensor» de oxígeno. En normoxia, los niveles de oxígeno en el citoplasma permanecen constantemente elevados, permitiendo la correcta activación de las PHDs, a pesar del rápido consumo de oxígeno por las mitocondrias. Al producirse un déficit de oxígeno, la mitocondria consume el escaso O_2 disponible en el proceso de fosforilación oxidativa y su concentración citoplasmática disminuye inhibiendo las PHDs. En una hipoxia prolongada, el consumo de O_2 por la mitocondria se inhibe y el O_2 se redistribuye hacia el citoplasma, re-activando las PHDs. (Ginouvés et al., 2008; Hagen et al., 2003; Hirsilä et al., 2003).

Hierro y otros iones metálicos divalentes: La asociación de Fe^{2+} al lugar activo de las PHDs es muy fuerte y su valor de K_m es menor de 0.1 μ M (Hirsilä et al., 2005). Sin embargo, se ha observado que el Fe^{2+} puede ser extraído rápidamente por agentes quelantes como los iones metálicos Co^{2+} , Ni^{2+} o Mn^{2+}

mimetizando el efecto de la hipoxia (Epstein et al., 2001; Goldberg et al., 1988). Además, el Co^{2+} y el Ni^{2+} también afectan la actividad de las PHDs al disminuir los niveles intracelulares de ascorbato (Salnikow et al., 2004). *In vivo*, el Fe^{2+} requiere de proteínas de transporte como las chaperonas citosólicas *poly (rC) binding protein 1 y 2 (PCBP1 y PCBP2)* que forman complejos donadores de Fe^{2+} y su carencia resulta en una reducción en la actividad de las PHDs (Nandal et al., 2011). La disponibilidad de Fe^{2+} también puede verse afectada por otros factores como la acumulación de especies reactivas del oxígeno (**ROS** por sus siglas en inglés). El equipo de Mechta-Grigoriu demostró que la producción de ROS, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en células *junD*^{-/-} conlleva una pérdida en la disponibilidad de Fe^{2+} como consecuencia de su oxidación y la consiguiente inhibición de las PHDs (Gerald et al., 2004).

Inhibición competitiva por intermediarios metabólicos: El **2-oxoglutarato** es además de un co-substrato de las PHDs, un intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Hirsilä et al., 2003). Así, intermediarios del ciclo de Krebs como el succinato y el fumarato compiten con el 2-oxoglutarato por la unión al lugar activo de las PHDs y las inhiben (Selak et al., 2005). En condiciones fisiológicas, la concentración de estas moléculas es baja y no afecta a la actividad de las PHDs. Sin embargo, defectos en el ciclo de Krebs como mutaciones en los genes supresores de tumores, succinato deshidrogenasa (SDH) o fumarato hidratasa (FH), aumentan sus niveles lo que inhibe la actividad de las PHDs (Hewitson et al., 2007; Isaacs et al., 2005; Koivunen et al., 2007; Selak et al., 2005). No está claro el papel de otras moléculas como el **oxalacetato** (intermediario del ciclo de Krebs), el **piruvato** y el **lactato** (intermediarios de la glicólisis) puesto que inhiben la actividad de las PHDs en algunas condiciones experimentales aunque no en otras (Lu et al., 2002; Pan et al., 2007). Finalmente, se ha descrito que mutaciones en la isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH-1 e IDH-2), que catalizan la conversión de isocitrato a 2-oxoglutarato, disminuyen los niveles de 2-OG y por lo tanto, la actividad de las PHDs (Zhao et al., 2009).

En base a la regulación de las PHDs por el 2-oxoglutarato se han desarrollado una serie de inhibidores farmacológicos ampliamente usados en experimentación e incluso en ensayos clínicos. El más destacado es **dimetiloxalilglicina** (DMOG) aunque también podemos mencionar **L-mimosina** (L-Mim), **3,4-dihidroxibenzoato** (3,4 DHB) y otros derivados piridínicos (Mole et al., 2003; Warnecke et al., 2003; Warshakoon et al., 2006).

Ascorbato: En el estudio del equipo de Mechta-Grigoriu, la adición de altas concentraciones de ascorbato a células deficientes en *junD* y tratadas con iones divalentes fue capaz de reactivar las PHDs (Gerald et al., 2004). Los iones divalentes inactivan las PHDs al impedir la entrada de ascorbato en la célula (Salnikow et al., 2004). Otros agentes, como el glutatión, pueden sustituir al ascorbato a la hora de mantener reducido el Fe^{2+} (Nytko et al., 2011; Tennant y Gottlieb, 2010).

Óxido nítrico (NO): El sentido de la regulación de las PHDs por el NO parece depender de su concentración celular. Así, concentraciones elevadas de NO (>1 μ M) inhiben la actividad de las PHDs en normoxia al competir por el O₂ disponible o al quelar el Fe²⁺ (Yuan et al., 2003; Salnikow et al., 2004; Zhang et al., 2002). Concentraciones inferiores de NO (<0.4 μ M) inhiben la citocromo-c oxidasa provocando una reducción en el consumo de O₂ que se redistribuye hacia el citoplasma y activando las PHDs (Hagen et al., 2003; Pan et al., 2007).

Finalmente, queremos destacar que ciertas proteínas son capaces de interactuar con las PHDs, incrementando las concentraciones locales de estas enzimas, lo que se traduce por un aumento en su actividad. Entre estas proteínas encontramos: la *Osteosarcoma Precursor 9 (OS-9)* que es capaz de unirse a HIF-1 α y PHD2 y en menor medida a PHD3 (Baek et al., 2005), *A-kinase anchor protein 12 (AKAP12)* que incrementa la interacción de HIF-1 α , pVHL y PHD2 (Choi et al., 2007), *LIM domain containing protein 1 (LIMD1)*, que se une simultáneamente a PHD2 y pVHL (Foxler et al., 2012), *Map organizer 1 (MORG1)*, que forma complejos con PHD3 (Hopfer et al., 2006); la chaperona *TCP-1 ring complex (TriC)* que interactúa con PHD3 y pVHL favoreciendo la activación de PHD3 (Masson et al., 2004).

II.1.4 Dianas de las PHDs e implicaciones fisiopatológicas

II.1.4.1 Hypoxia Inducible Factor (HIF)

Como se ha mencionado anteriormente, la evolución de las PHDs corre paralela a la de su sustrato inicial: HIF. HIF está compuesto por una **subunidad α** de 120 kDa acoplejada a una **subunidad β** , denominada también ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) (Reyes et al., 1992; Wang et al., 1995). La regulación de la estabilidad de HIF por las PHDs es, sin duda, el mecanismo clave de regulación de la cascada de señalización de hipoxia. En mamíferos, se han descrito tres isoformas para la subunidad α : **HIF-1 α** , que se expresa de manera ubicua, **HIF-2 α** , que se restringe a tejidos altamente vascularizados, e **HIF-3 α** , identificada mayoritaria en ojo, cerebro y cerebelo (Ema et al., 1997; Makino et al., 2001; Makino et al., 2002; Tian et al., 1997; Wang et al., 1995). Existen dos isoformas de la subunidad β en mamíferos: **HIF-1 β** e **HIF-2 β** , aunque la primera es la isoforma que forma complejo con HIF- α y se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos (Hirose et al., 1996; Wang et al., 1998; Wang et al., 1995). Las subunidades α y β contienen en su extremo N-terminal dominios Basic-Helix-Loop-Helix (**bHLH**) y Per-Arnt-Sim (**PAS**) que median la unión de HIF a una secuencia consenso en ADN (5'-[G/A] CGTG-3') en los HREs de genes diana y son necesarios para la dimerización de las dos subunidades, respectivamente (Gradin et al., 1996., Wang et al., 1995; Wenger et al., 2005). En su extremo C-terminal, cada subunidad del complejo HIF contienen al menos un **Dominio de Transactivación (TAD)** por sus siglas en inglés). El TAD de HIF-1 α e HIF-2 α el TAD se subdivide en un dominio de activación N-terminal (NTAD) y un dominio de activación C-terminal (CTAD)

entre los cuales se sitúa un dominio inhibidor de la transcripción (ID por sus siglas en inglés) (Jiang et al., 1997). HIF- α se caracteriza, además, por la presencia de un **Dominio de Degradación Dependiente de Oxígeno (ODDD)** por sus siglas en inglés) que regula su estabilidad (Huang et al., 1998; Pugh et al., 1997; Salceda y Caro, 1997). En condiciones de normoxia, la prolinas P402 y P564 de HIF-1 α humano (P405 y P531, en el caso de HIF-2 α) son dianas de las PHDs (Bruick y McKnight, 2001; Epstein et al., 2001; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Masson et al., 2001). Esta modificación regula la unión a la proteína supresora de tumores **pVHL** (producto del gen *von Hippel-Lindau*) que forma, junto con elonginaB, elonginaC, Cul2 y Rbx, un complejo E3 ubiquitina-ligasa que poli-ubiquitina HIF- α dirigiéndolo a su degradación en el proteasoma 26S (Huang et al., 1996; Maxwell et al., 1999; Salceda y Caro., 1997). De manera general, PHD2 y PHD3 presentan una mayor actividad sobre HIF- α que PHD1 (Huang et al., 2002; Tuckerman et al., 2004). Las tres isoformas de PHDs contribuyen de manera diferencial a la regulación de HIF-1 α e HIF-2 α , dependiendo, en parte, de su abundancia relativa en cada tejido (Appelhoff et al., 2004). No obstante, PHD2 juega un papel preponderante en el mantenimiento de los niveles basales de HIF- α en condiciones de normoxia (Berra et al., 2003). Además de por las PHDs, HIF- α es hidroxilado por el **Factor Inhibiting HIF (FIH)** en la asparagina 803 del CTAD de HIF-1 α , reprimiendo su actividad transactivadora al interrumpir el reclutamiento de los co-activadores p300 y *Creb Binding Protein* (CBP) (Arany et al., 1996; Lando et al., 2002; Mahon et al., 2001). Esta hidroxilación dual mantiene a HIF en un estado inestable e inactivo en condiciones de normoxia. Un déficit de oxígeno, sin embargo, inhibe las PHDs y estabiliza HIF- α permitiendo su dimerización con HIF- β . Además, la inhibición de FIH facilita la asociación de p300/CBP y el complejo transcripcional es capaz de unirse a las secuencias HREs de los genes diana y desencadenar su transactivación (Figura II.1.4.1).

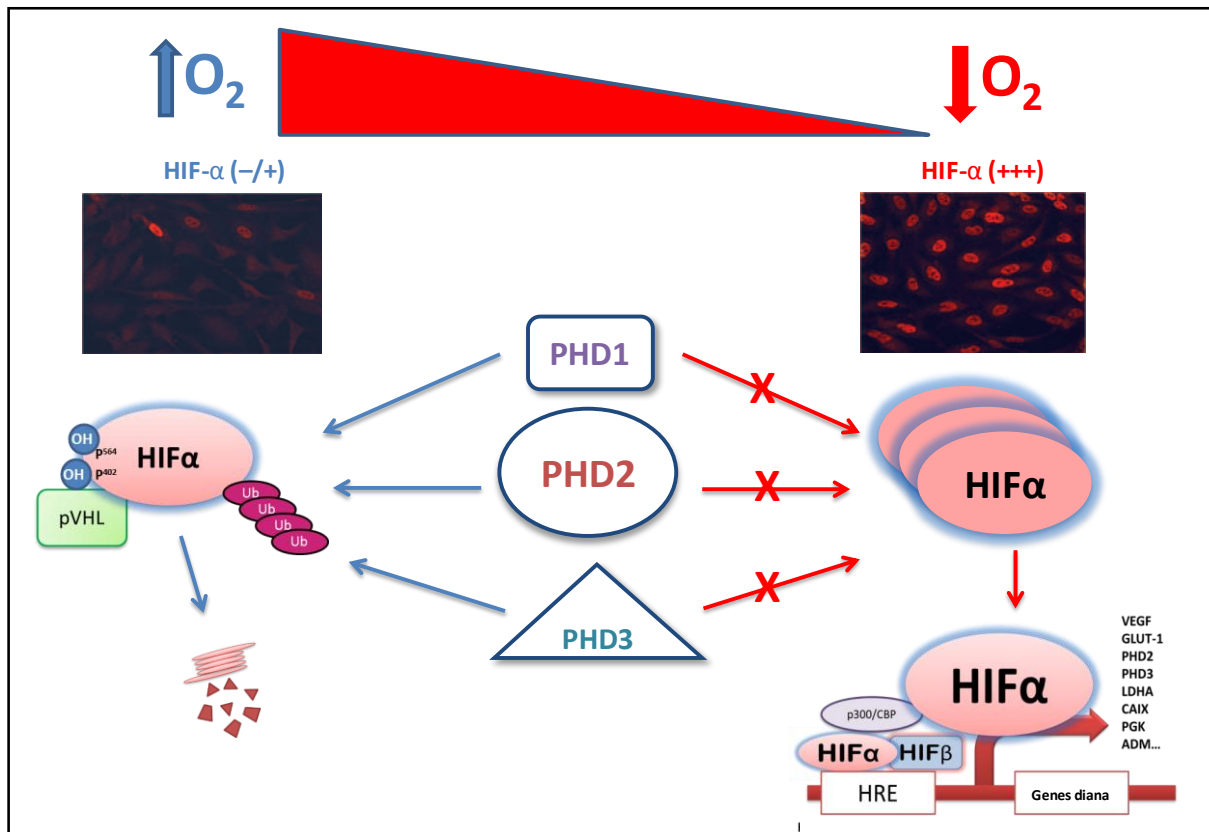


Figura II.1.4.1. Regulación de HIF- α por las PHDs. En normoxia, HIF- α es hidroxilado por las PHDs en residuos de prolina presentes en el ODDD. En consecuencia, HIF- α se une a pVHL, se poli-ubiquitina y se degrada en el proteasoma. En hipoxia, las PHDs se inactivan por la deficiencia de O_2 e HIF- α se estabiliza como se observa en la inmunofluorescencia anti-HIF1 α . HIF1 α heterodimeriza con HIF- β y se asocia a los HRE junto con co-factores como p300/CBP e induce la expresión de los genes diana involucrados en la respuesta a hipoxia. Adaptado de Berra et al (2006).

HIF induce la expresión de una amplia variedad de genes implicados en el mantenimiento de la homeostasis del O_2 tanto en condiciones fisiológicas (ejercicio, desarrollo embrionario, elevadas altitudes...) como patológicas (inflamación, formación de tumores, enfermedades pulmonares, isquemia cerebral, infarto de miocardio...). El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF por sus siglas en inglés), la hemo oxigenasa 1 (HO1), el transportador de glucosa GLUT1 y la eritropoyetina (EPO) son sólo algunos ejemplos de genes diana (Chen et al., 2001; Forsythe et al., 1996; Levy et al., 1995; Liu et al., 1995; Semenza et al., 1991). Cabe mencionar que todos estos genes tienen como finalidad aumentar la disponibilidad de oxígeno o reducir su consumo.

La hipoxia tumoral se asocia con un incremento en la malignidad tumoral, mala prognosis y resistencia a radio y quimioterapia (Bertout et al., 2008). Acorde con su papel en la regulación de HIF- α , la expresión de las PHDs se encuentra disminuida en diferentes tipos de tumores. Así, los niveles de PHD3 están disminuidos en cáncer colorrectal (Xue et al., 2010) y la expresión de PHD2 disminuye la proliferación

celular y tumorigénesis en células endoteliales, fibroblastos y tumores gliales (Henze et al., 2010; Lee et al., 2008; Takeda y Fong, 2007). Asimismo, la inhibición de la actividad de las PHDs debido a mutaciones en la SDH o la FH se ha relacionado con síndromes tumorales (Isaacs et al., 2005; Ricketts et al., 2009). Por otro lado, los tumores implantados en ratones *Phd2*^{-/+} son menos hipóxicos, agresivos, metastásicos e invasivos (Leite de Oliveira et al., 2012; Mazzone et al., 2009). Además, estos tumores son más sensibles a drogas quimioterapéuticas como consecuencia de una mejor vascularización del tumor y la reducción de los efectos tóxicos en los órganos colindantes (Leite de Oliveira et al., 2012).

Por otra parte, estudios en ratones deficientes en *phd1* indican que esta proteína media la adaptación metabólica a hipoxia en el músculo esquelético. La pérdida de *phd1* reduce la entrada de piruvato al ciclo de Krebs, debido al incremento en la expresión de PPAR, PDK1 y PDK4 que inhiben el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), en un proceso dependiente de HIF-2 α (Aragonés et al., 2008). En consecuencia, ratones *Phd1*^{-/-} presentan tolerancia a hipoxia al disminuir el consumo de O₂, la formación de ROS y, por ende, el daño mitocondrial. Un fenotipo similar se observa en neuronas de ratones *Phd1*^{-/-}. En respuesta a isquemia, estas neuronas muestran un incremento del flujo glicolítico a través de la ruta de las pentosas fosfato y en consecuencia, tolerancia a hipoxia al incrementar su capacidad redox (Quaegebeur et al., 2016).

La inducción de PHD3, vía HIF en procesos inflamatorios que cursan en un microambiente hipóxico, regula la supervivencia de los neutrófilos. En efecto, ratones *Phd3*^{-/-} muestran una respuesta inmune alterada con una menor infiltración de neutrófilos que se atribuye a un incremento en el factor pro-apoptótico Siva1 y una disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL (Walmsley et al., 2011). Por el contrario, en macrófagos, la pérdida de PHD3 está relacionada con una respuesta hiper-activada del sistema inmune innato. Al ser expuestos a sepsis abdominal, los ratones *Phd3*^{-/-} exhiben un incremento en el reclutamiento de macrófagos a órganos internos y un aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Kiss et al., 2012). Asimismo, se intensifica la capacidad fagocítica y migratoria de los macrófagos indicando que PHD3 limita la respuesta pro-inflamatoria de macrófagos a patógenos (Escribese et al., 2012; Kiss et al., 2012).

La señalización PHDs/HIF desempeña también un papel crucial en la homeostasis del hueso (Provot y Shipani, 2007; Provot et al., 2007; Shipani et al., 2001). Recientemente se ha descrito que la inactivación conjunta de PHD2 y PHD1 o PHD3 produce un incremento en el volumen trabecular del hueso y protege de la pérdida de masa ósea consiguiente a una ovariectomía. Ello es debido a la supresión de la osteoclastogénesis por los osteoblastos a través de la expresión, mediada por HIF, de osteoprotegerina (Wu et al., 2015). Los niveles de HIF han de ser finamente regulados en este proceso ya que la inactivación

conjunta de las tres PHDs provoca la osificación extrema de las trabéculas del hueso y hematopoyesis aberrante como consecuencia de un aumento excesivo en los niveles de HIF.

II.1.4.2 Otras dianas directas de las PHDs

β/γ -actina: PHD3 está implicado en el control de la estructura, motilidad y polaridad epitelial gracias a su capacidad de hidroxilar β y γ -actina. Dicha hidroxilación favorece el estado monomérico (G-actina) y bloquea el ensamblaje de F-actina (Luo et al., 2014).

Cep192: La hidroxilación de Cep192 por PHD1 es necesaria para su correcta localización y la mutación de las prolinas dianas (P/A) resulta en la acumulación de la proteína que conlleva defectos en la duplicación de los centriolos, la maduración del centrosoma y fallo en la formación del huso mitótico (Moser et al., 2013). Este mismo año se ha descrito que CDK2, CDK4 y CDK5 fosforilan la serina 130 de PHD1 e incrementan su afinidad por Cep192, facilitando la progresión del ciclo celular (Ortmann et al., 2016).

Fosfodiesterasa 4D (PDE4D): PHD2 hidroxila PDE4D y la dirige a su degradación en un modelo de cardiomiocitos. Esta modificación garantiza la función contráctil de los sarcómeros al mantener los niveles de AMPc (Huo et al., 2012).

FOXO3a: La hidroxilación de FOXO3a por PHD1 previene la unión de la de-ubiquitinasa USP9x y promueve su degradación por el proteasoma (Zheng et al., 2014). FOXO3a reprime, entre otros, la transcripción de ciclina-D1 y explica, al menos parcialmente, el fenotipo de ratones *Phd1*^{-/-}. Estos ratones muestran hipo-proliferación de la glándula mamaria y la pérdida de PHD1 en tumores mamarios ER α (+) suprime la proliferación celular y el crecimiento del tumor debido a la disminución en los niveles de **ciclina-D1** (ARNm y proteína) (Zhang et al., 2009).

Human CDC-like kinase 2 (HCLK2): PHD3 promueve la apoptosis al activar la ruta de señalización ATR-Chk1-p53 en respuesta al daño en el ADN a través de la hidroxilación de la HCLK2 (Xie et al., 2012).

IKK β : Cummins y colaboradores observaron que el tratamiento con DMOG, la mutación de la prolina 191 de IKK β y el silenciamiento de PHD1 activan la vía de NF κ B (Cummins et al., 2006). En este trabajo se propuso que la hidroxilación de IKK β previene su activación al impedir la fosforilación de las serinas 177 y 181 y consecuentemente, la activación de NF κ B. Recientemente se ha confirmado la hidroxilación de IKK β en la prolina 191 propuesta inicialmente si bien el mecanismo de inactivación no se ha esclarecido por el momento (Zheng et al., 2014). Además, durante la diferenciación del músculo esquelético, la actividad hidroxilasa de PHD3 es necesaria en la represión de la vía IKK β /NF κ B aunque no está claro si PHD3 hidroxila a IKK β (Fu y Taubman, 2010).

Isoforma M2 de la piruvato quinasa (PKM2): PHD3 es capaz de hidroxilar las prolinas 403/408 de PKM2 lo que incrementa su interacción con HIF-1 α y promueve su actividad. Se establece así un mecanismo de retroalimentación positiva que regula el metabolismo anaeróbico de la glucosa (Luo et al., 2011).

Receptor β 2-adrenérgico: El receptor acoplado a proteína G β 2-adrenérgico, cuya activación causa vasodilatación, presenta un ODDD similar al de HIF- α . La hidroxilación de este dominio es catalizada por PHD3 y conlleva su degradación dependiente de pVHL (Xie et al., 2009).

Receptor de la hormona tiroidea- α (TR- α): La inhibición de PHD2/3 facilita la interacción de TR- α con el represor transcripcional NCOR2 y disminuye la expresión de fosfolambina que activa CaMKII y provoca daño cardíaco (Xie et al., 2015a; Xie et al., 2015b).

Transient receptor potential cation channel A1 (TRPA1): La hidroxilación de TRPA1 por PHD1 y PHD3 inhibe su actividad como canal iónico (Takahashi et al., 2011). No obstante, se ha propuesto que TRPA1 actúa en tanto que «sensor» de oxígeno antagonizando el efecto de las PHDs sobre su propia actividad.

Diana	PHD1	PHD2	PHD3	Función	Referencia
β/γ -actina			✓	Polaridad epitelial	Luo et al., 2014
Cep192	✓			Ciclo celular	Moser et al., 2013
FOXO3a	✓			Proliferación celular	Zheng et al., 2014
HCLK2			✓	Respuesta a daño en el ADN	Xie et al., 2012
HIF	✓	✓	✓	Homeostasis de oxígeno	Bruick y McKnight, 2001 Epstein et al., 2001
IKK β	✓		✓	Vía canónica de NF κ B	Cummins et al., 2007 Fu y Taubman, 2010
PDE4D		✓		Niveles intracelulares de AMPc	Huo et al., 2012
PKM2			✓	Metabolismo de la glucosa	Luo et al., 2011
Receptor β -adrenérgico			✓	Contractilidad endotelial y cardíaca	Xie et al., 2009
TR- α		✓	✓	Contractilidad cardíaca	Xie et al., 2015a
TRPA1	✓		✓	Actividad de canales iónicos	Takahashi et al., 2011

Tabla II.1.4.2. Dianas directas de las PHDs. Listado de los sustratos hidroxilados por las PHDs y sus consecuencias.

II.1.4.3 [Dianas plausibles cuya regulación depende de la actividad catalítica](#)

Activating Transcription Factor 4 (ATF4): ATF4 es un miembro de la familia de factores de transcripción ATF/CREB de regiones básicas/zipper de leucina (bZIP, por sus siglas en inglés) cuya activación es inducida en condiciones de hipoxia. Además, ATF4 media la respuesta a estrés por privación de aminoácidos (ISR por

sus siglas en inglés) o estrés del retículo endoplasmático (ERE) (Ameri et al., 2004; Blais et al., 2004; Fawcett et al., 1999; Hai y Hartman, 2001; Harding et al., 2003). Entre los genes diana de ATF4 se incluyen genes responsables del balance redox (HO1), apoptosis (CHOP, TRB3), metabolismo de aminoácidos (ASNS, CAT-1) o reparación del ADN (Oskolkova et al., 2008; Rzymiski et al., 2009; Siu et al., 2002).

Se ha descrito que la hipoxia y los inhibidores de PHDs son capaces de estabilizar los niveles de ATF4. La presencia de 5 prolinas conservadas en ATF4 ha sido considerada como un nuevo ODDD (Köditz et al., 2007; Wottaba et al., 2010). Por otro lado, PHD1 y PHD3 regulan negativamente la actividad transcripcional de ATF4 inducida por hipoxia o ERE (Hiwatashi et al., 2011; Köditz et al., 2007).

CD24: Resultados de nuestro laboratorio en colaboración con el grupo de la Dra. MdM Vivanco han demostrado que el silenciamiento de PHD3, pero no de PHD1 ni PHD2, al igual que la hipoxia incrementa la proporción de la subpoblación CD44⁺CD24^{low} de células madre cancerígenas (CSCs por sus siglas en inglés) en cáncer de mama ER(-). Ello es consecuencia de la desdiferenciación de la masa tumoral y el bloqueo de la diferenciación de las CSCs. Dicha regulación implica cambios en la expresión de CD24 que son independientes de HIF (Iriando et al., 2015).

eEF2: PHD2 regula la activación de la translocasa ribosomal eEF2. En condiciones de hipoxia, eEF2 es fosforilado en la treonina 56 y la síntesis proteica se inhibe. En condiciones de normoxia, PHD2 promueve la desfosforilación de eEF2, re-activando la síntesis proteica (Romero-Ruiz et al., 2012). No está claro si PHD2 ejerce su efecto sobre eEF2 o a través de la modulación de otras proteínas como las fosfatasa (Romero-Ruiz et al., 2012).

KIF1β: La privación de NGF activa la vía de c-Jun y la consiguiente inducción de *Phd3* que regula la expresión de esta quinesina provocando la liberación de citocromo c y la consiguiente muerte celular (Schlisio et al., 2008). En efecto, KIF1β media la apoptosis de precursores neuronales para garantizar la supervivencia selectiva de las neuronas correctamente conectadas durante el desarrollo embrionario. Además, mutaciones de esta quinesina se han asociado con el desarrollo de meduloblastomas, neuroblastomas y feocromocitomas (Bishop et al., 2008; Lee et al., 2005; Lipscomb et al., 1999; Straub et al., 2003).

Miogenina: PHD3 interacciona con miogenina, proteína esencial en el proceso de miogénesis, previniendo su degradación dependiente de pVHL (Fu et al., 2007).

Paired box 2 (Pax2): PHD3 regula negativamente la expresión de Pax2, factor de transcripción fundamental durante la embriogénesis, al mediar su degradación por el proteasoma. En cáncer colorrectal, se observó una disminución en los niveles de PHD3 que se correlacionaron con un incremento en Pax2 y ciclina-D1 (Yan et al., 2011; Zhang et al., 2012).

Vía de Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 (mTORC1): Además de su función en tanto que «sensores» de oxígeno, las PHDs proporcionan un mecanismo capaz de transmitir señales intracelulares en función de la disponibilidad en aminoácidos. El equipo de Gottlieb y colaboradores observó que la pérdida de α -cetoglutarato (producto del catabolismo de aminoácidos) en células sometidas a privación de aminoácidos, al igual que la hipoxia, inhibe la actividad de las PHDs, aunque sorprendentemente sin afectar la estabilidad de HIF- α . La inhibición de las PHDs indujo el proceso de autofagia y previno la activación de mTORC1 que se inactiva cuando los niveles de aminoácidos son limitantes, en un proceso que implica la pequeña GTPasa Rag (Durán et al., 2013).

Diana	PHD1	PHD2	PHD3	Función	Referencia
ATF4	✓		✓	Respuesta a estrés	Hiwatashi et al., 2011 Köditz et al., 2007 Wottaba et al., 2010
CD24			✓	Stemness	Iriondo et al., 2015
eEF2		✓		Síntesis proteica	Romero-Ruiz et al., 2012
KIF1 β			✓	Apoptosis neuronal	Schlisio et al., 2008
Miogenina			✓	Diferenciación músculo esquelético	Fu et al., 2007 Fu y Taubman, 2010
mTORC1	✓	✓	✓	Síntesis proteica	Durán et al., 2013
Pax2			✓	Proliferación celular	Yan et al., 2011

Tabla II.1.4.3 Dianas plausibles de las PHDs. Listado de posibles dianas directas o indirectas de las PHDs cuya regulación depende de su actividad hidroxilasa.

II.1.4.4 Dianas que no dependen de la actividad catalítica

Bcl-2: Se ha propuesto que PHD3 interacciona con Bcl-2, inhibiendo la formación del complejo anti-apoptótico Bax-Bcl-2 en cardiomiocitos (Liu et al., 2010).

FDXR: PHD1 forma un complejo activador con el *Nuclear Respiratory Factor 1* (NRF1) y PGC1 α que promueve la transcripción de la ferridoxín reductasa (FDXR) y que mantiene la actividad mitocondrial (Zhang et al., 2015).

hPRP19: PHD3 forma complejos con hPRP19 que inhiben la muerte celular en respuesta a hipoxia (Sato et al., 2010).

IKK β : En un modelo de cáncer de colon, PHD3 impide la unión de IKK β a HSP90, inhibiendo la fosforilación y activación de IKK β (Xue et al., 2010).

Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR): PHD3 media la internalización del EGFR (Garvalov et al., 2014). Independientemente de su actividad hidroxilasa, PHD3 actúa como una proteína de andamiaje que se asocia con el adaptador endocítico Eps15 y promueve la internalización de EGFR en complejo con Grb2 (Garvalov et al., 2014; Henze et al., 2014). En consecuencia, la pérdida de PHD3 en glioma promueve la progresión tumoral (Garvalov et al., 2014; Henze et al., 2014).

Receptor-Interactin Protein 1 (RIP1): PHD3 interacciona con RIP1 e interfiere en la unión entre RIP1 y cIAP1, atenuando la activación de NFκB inducida por RIP1 (Fu, 2016).

Subunidad E1β de la PDH: Se ha descrito que PHD3 interacciona con la subunidad E1β de la PDH desestabilizando el complejo (Kikuchi et al., 2014). Gracias a este mecanismo, MEFs y células MCF7 PHD3^{-/-} producen menos ROS y son más resistentes a muerte celular durante una hipoxia prolongada (Kikuchi et al., 2014).

Diana	PHD1	PHD2	PHD3	Función	Referencia
Bcl-2			✓	Apoptosis	Liu et al., 2010
EGFR			✓	Señalización de EGFR	Garvalov et al., 2014 Henze et al., 2014
E1β			✓	Metabolismo de la glucosa	Kikuchi et al., 2014
FDXR	✓			Función mitocondrial	Zhang et al., 2015
hPRP19			✓	Muerte celular	Sato et al., 2010
IKKβ			✓	Vía no canónica de NFκB	Xue et al., 2010
RIP1			✓	Vía de NFκB	Fu, 2016

Tabla II.1.4.4. Listado de posibles dianas directas o indirectas de las PHDs cuya regulación es independiente de su actividad hidroxilasa.

II.2 Las modificaciones post-traduccionales y los sensores de oxígeno: papel de SUMO

Las modificaciones post-transcripcionales (PTMs por sus siglas en inglés) suponen la adición de un grupo funcional (fosfato, acetilo, ubiquitina, SUMO...) sobre la proteína diana e influyen prácticamente en todos los aspectos de la biología celular. Se estima que el 5% del proteoma corresponde a enzimas que llevan a cabo 200 tipos de PTMs diferentes y que prácticamente todas las proteínas sufren algún tipo de PTM. Las PHDs no son una excepción y así, como ya se ha mencionado, Siah1/2 media la ubiquitinación de PHD1 y

PHD3 (Nakayama et al., 2004). Este mismo año, se ha demostrado que PHD1 es fosforilada por varias CDKs (Ortmann et al., 2016). En concreto, se ha descrito que CDK2, CDK4 y CDK5 fosforila la serina 130 de PHD1 modulando su actividad a lo largo del ciclo celular e incrementan su afinidad por Cep192 (Ortmann et al., 2016). Nuestro laboratorio se ha interesado particularmente en el estudio de la SUMOilación de las PHDs.

II.2.1 Cascada de SUMOilación

La SUMOilación es una modificación post-traducciona que implica la modificación por **Small Ubiquitin Related Modifier (SUMO)** de la proteína diana. SUMO es un pequeño polipéptido, de 10 kDa, de la familia de las proteínas semejantes a ubiquitina (Cheng et al., 2006a; Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996). Se encuentra altamente conservada entre especies. Las levaduras y *Caenorhabditis elegans* expresan una única proteína SUMO, denominada *Suppressor of mif two 3 (Smt3)* (Choudhury y Li, 1997; Johnson et al., 1997; Lapenta et al., 1997). En el caso de *Drosophila melanogaster*, estudios recientes han puesto de manifiesto la presencia de dos genes parálogos, uno de los cuales se perdió antes de la divergencia de los himenópteros (Bhaskar et al., 2000; Ureña et al., 2016). Otros eucariotas, incluyendo plantas y vertebrados, presentan más de una proteína. Los mamíferos exhiben 4 parálogos de SUMO, denominados SUMO1, SUMO2, SUMO3 y SUMO4 (Bohren et al., 2004)

SUMO2 y SUMO3 son idénticas en un 95% y de hecho sólo se pueden distinguir por tres aminoácidos y se suelen denominar colectivamente como SUMO2/3. Estos SUMOs muestran un 45% de homología con SUMO1 y todos los parálogos de mamíferos se asemejan a Smt3p en un 45%. Se desconoce el papel que desempeña SUMO4 y, a día de hoy, no se sabe si puede ser procesado a su forma madura (Owerbach et al., 2005).

En lo referente a su organización estructural (Figura II.2.1.1), SUMO maduro presenta un motivo altamente conservado en su extremo C-terminal constituido por dos glicinas implicadas en su conjugación (Kamitani et al., 1997; Mahajan et al., 1998; Matunis et al., 1996). SUMO exhibe además una extensión N-terminal flexible de entre 15 y 20 aminoácidos, que no está presente en ubiquitina u otras UBLs (Bayer et al., 1998; Mahajan et al., 1997; Saitoh et al., 1997).

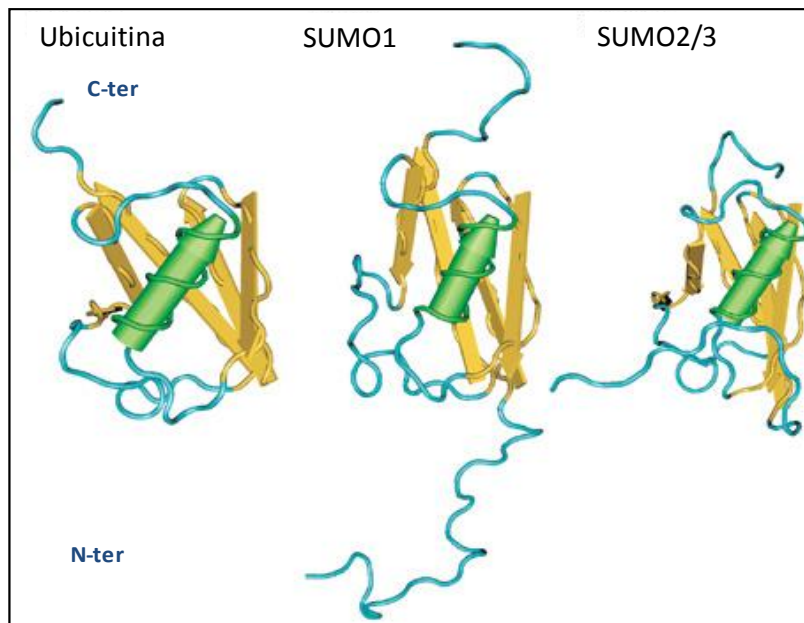


Figura II.2.1.1. Representación de la estructura 3D de ubiquitina, SUMO1 y SUMO2/3. SUMO1 y ubiquitina son idénticas en un 18% pero muestran una elevada semejanza en su estructura tridimensional. Adaptado de Martin et al (2007).

SUMO es conjugado a la proteína en un proceso semejante a la ubiquitinación pero que requiere de un grupo de enzimas específicas (Figura II.2.1.2). SUMO se traduce como una proteína inmadura que requiere de la escisión proteolítica de entre cuatro y once aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína. Después de la escisión, SUMO expone el motivo de dos glicinas que marca su extremo C-terminal (Johnson et al., 1997; Kamitani et al., 1997; Mahajan et al., 1998). Este procesamiento proteolítico, semejante al de la pro-ubiquitina, es catalizado por la familia de proteasas denominadas *Sentrin specific Proteases* (SENPs) (Li y Hochstrasser, 1999).

El motivo de dos glicinas C-terminal es activado por una enzima E1 en un proceso que implica la hidrólisis de ATP. En mamíferos se ha identificado una única enzima E1-activadora compuesta por dos subunidades denominadas **SAE1/Aos1** y **SAE2/UBA2** (Desterro et al., 1999; Johnson et al., 1997; Okuma et al., 1999). Se forma un grupo SUMO-adenilato que es seguido por la remodelación del lugar activo de la enzima E1 y la formación de un enlace tioéster de alta energía entre la cisteína presente en el lugar activo de UBA2 y la glicina C-terminal de SUMO (Johnson et al., 1997; Lois y Lima, 2005; Okuma et al., 1999).

A continuación SUMO es transferido desde UBA2 a la enzima E2 conjugadora **Ubc9** formando un enlace tioéster entre la cisteína catalítica de Ubc9 y el motivo de glicinas C-terminales de SUMO (Desterro et al., 1997).

Finalmente, Ubc9 transfiere SUMO al sustrato que presenta un motivo de SUMOilación consenso formando un puente isopeptídico entre el extremo C-terminal de SUMO y el grupo ε-amino de un residuo de lisina de la proteína diana (Nacerddine et al., 2005). Algunas dianas de SUMO requieren en este último paso de la contribución de una E3 SUMO-ligasa que cataliza la transferencia de SUMO de Ubc9 al sustrato (Mahajan et al., 1998; Matunis et al., 1998). Se han descrito cinco grupos de E3 SUMO-ligasas.

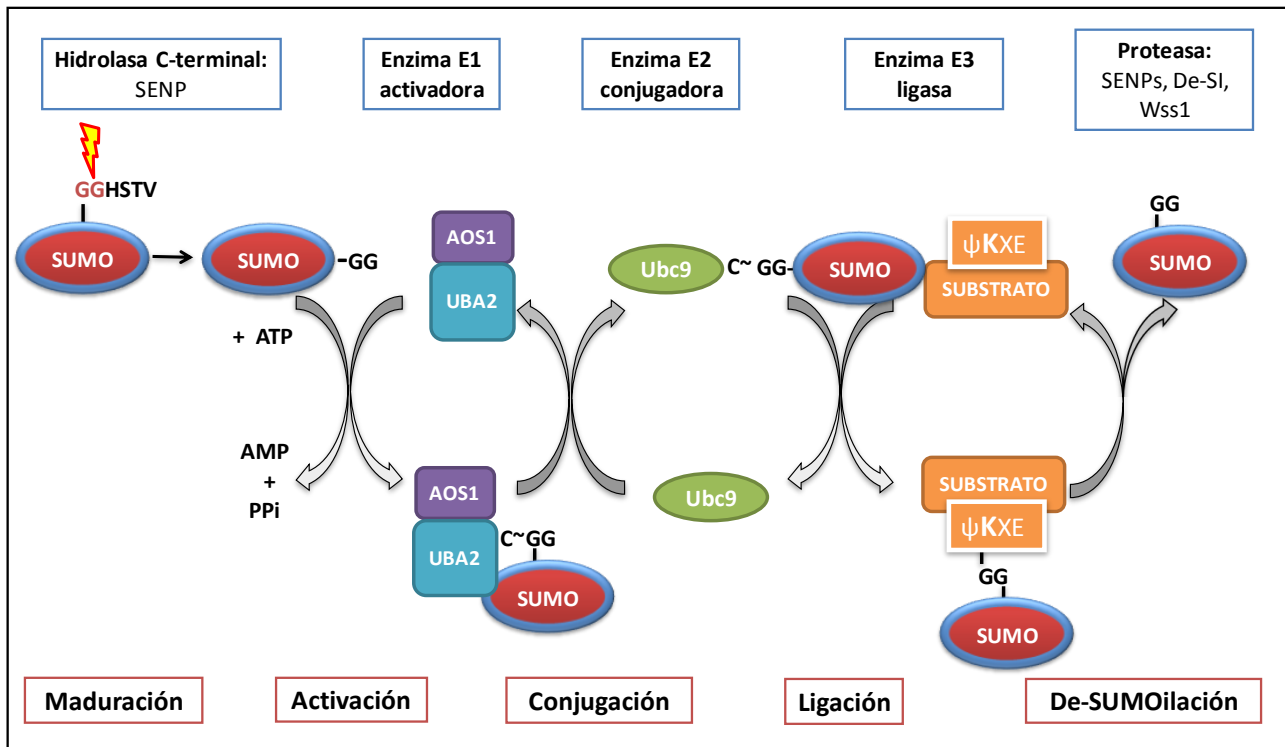


Figura II.2.1.2. Cascada de SUMOilación.

Familia de la proteína inhibidora de STAT activado (PIAS): Es la familia más amplia y contiene un dominio SP-RING y un dominio PINIT que selecciona la lisina diana (Azuma et al., 2005; Kahyo et al., 2001; Palvimo, 2007; Takahashi et al., 2001). Se han identificado seis miembros en humanos: PIAS1, PIASα, PIASβ, PIAS3, PIASγ y Nse2/Msm21 (Andrews et al., 2005; Kahyo et al., 2001; Potts y Yu, 2005; Sachdev et al., 2001; Sapetschnig et al., 2002; Schmidt y Müller, 2002).

RanBP2: Presenta actividad E3 SUMO-ligasa frente a Sp100, la clase II de histona deacetilasas, RanGAP1 y la proteína activadora de la GTPasa Ran (Kirsh et al., 2002; Matunis et al., 1998; Pichler et al., 2002; Saitoh et al., 1998). RanBP2 se compone de un dominio de repetición interno formado por dos secuencias de 50 residuos (IR1 e IR2) separados por 24 residuos (M). La actividad catalítica de la enzima reside en los fragmentos IR1+M que se une de manera estable a Ubc9 favoreciendo su actividad catalítica sin interaccionar con la proteína sustrato (Pichler et al., 2002; Pichler et al., 2004; Reverter y Lima, 2005).

Pc2/CBX4: Es un componente del complejo multimérico policomb represorio 1 (PRC1 por sus siglas en inglés) y puede actuar como SUMO ligasa al unirse a Ubc9 y a dianas de conjugación. Entre las dianas de Pc2 se encuentra el co-represor transcripcional *Carboxyl-terminus Binding Protein* (CtBP1) (Kagey et al., 2003). Pc2 contribuye también a la SUMOilación de lugares de lesión del ADN (Ismail et al., 2012).

Histona deacetilasa 4 (HDAC4): La expresión de esta E3 ligasa promueve la SUMOilación del factor promotor específico de miocitos (MEF2 por sus siglas en inglés) (Zhao y Blobel, 2005). HDAC4 ejerce su función al unirse a Ubc9 aunque también se ha sugerido que puede promover la SUMOilación al fosforilar lugares adyacentes a la lisina diana de conjugación (Yang y Gregoire, 2006).

TOPORS: Es una proteína que contiene un dominio dedo de RING y un motivo de interacción a SUMO (Hecker et al., 2006). Se caracteriza por su actividad E3 SUMO y ubiquitina-ligasa (Weger et al., 2005). Algunas de sus dianas son la ADN-topoisomerasa I y p53 (Weger et al., 2005).

Los sustratos de SUMO no sólo pueden ser mono-conjugados sino que pueden sufrir modificaciones posteriores por SUMO (Figura II.2.1.3). Así, una diana de SUMO puede ser modificada en varias lisinas (multiple-mono SUMOilación) y SUMO2/3 pueden formar cadenas de poli-SUMO sobre la lisina 11 (Tatham et al., 2001). SUMO1 carece de este residuo y, por lo tanto, es incapaz de formar cadenas de poli-SUMO aunque puede terminar dichas cadenas (Bayer et al., 1998; Matic et al., 2008). Cabe destacar la posibilidad de formar cadenas híbridas de SUMO y ubiquitina. La síntesis de estas cadenas depende la actividad de las ligasas de ubiquitina dirigidas por SUMO (**STUBLs** por sus siglas en inglés) que reconocen específicamente y ubiquitinan cadenas de SUMO presentes en proteínas sustrato. Estas cadenas son reconocidas por proteínas receptoras que contienen motivos de interacción con SUMO y ubiquitina (tSIM-UIMs) implicadas, por ejemplo en reparación del ADN (Guzzo y Matunis, 2013).

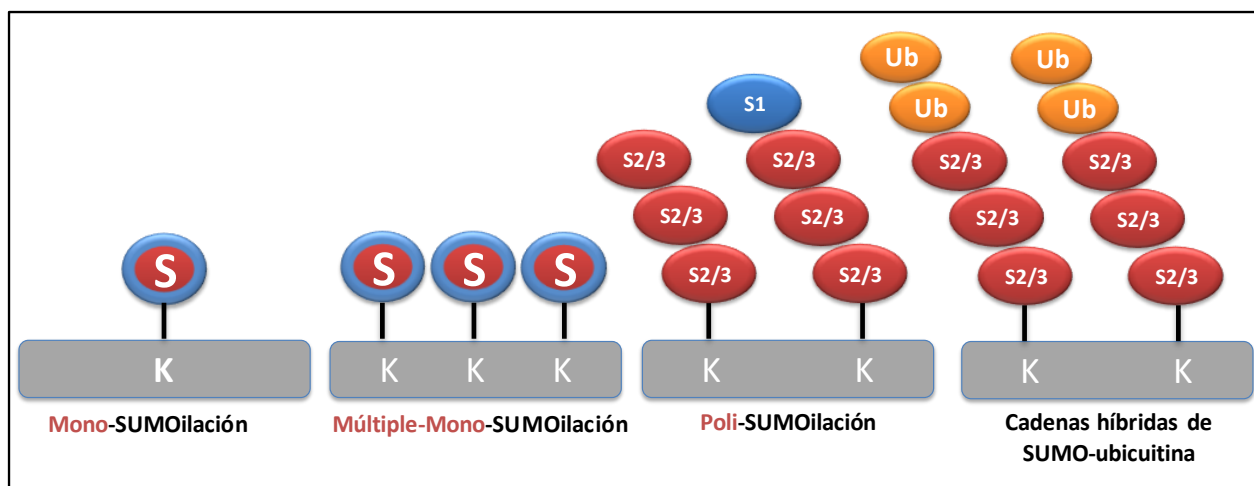


Figura II.2.1.3. Tipos de modificación por SUMO de un sustrato. La SUMOilación puede producirse una vez (mono-SUMOilación) repetidas veces sobre diferentes Ks (múltiple-mono SUMOilación) o sobre la misma K (poli-SUMOilación) formando cadenas. Las cadenas de SUMO están compuestas por SUMO2 o 3 y pueden estar terminadas por SUMO1. Adicionalmente, pueden formarse cadenas híbridas de SUMO-ubiquitina.

La SUMOilación es una modificación reversible. Las SENPs, además de su función hidrolasa C-terminal, presentan actividad isopeptidasa. Las enzimas que realizan esta función en levaduras son Ulp1 y Ulp2 (Li y Hochstrasser, 1999). En humanos hay seis homólogos de Ulp denominados SENPs: SENP1-3 y SENP5-7. SENP1-3 son semejantes a Ulp1, mientras que SENP6 y SENP7 son semejantes a Ulp2 (Mukhopadhyay y Daso, 2007). SENP1 y SENP2 se localizan en la membrana nuclear y tienen actividad frente a SUMO1 y SUMO2/3. SENP3 y SENP5 se localizan en el nucléolo y catalizan reacciones que implican SUMO2/3 (Di Bacco et al., 2006; Gong y Yeh, 2006). SENP6 y SENP7 se localizan en el nucleoplasma y están implicados en la edición de las cadenas de poli-SUMO (Lima y Reverter, 2008; Mukhopadhyay et al., 2006; Shen et al., 2009). Además de la familia de SENPs, USPL1, Wss1 y DeSI-1 se han descrito como de-SUMOilasas. USPL1 es una proteasa necesaria para el mantenimiento de los cuerpos de Cajal (Schulz et al., 2012). Wss1 se describió como una isopeptidasa que actúa sobre cadenas de poli-SUMO (Mullen et al., 2010) y DeSI-1 presenta actividad isopeptidasa pero no actividad procesadora de SUMO (Shin et al., 2012).

Al menos la mitad de las proteínas diana de SUMOilación presentan un motivo consenso que es reconocido por Ubc9: ψ KXD/E, donde ψ es un residuo alifático (L, I o V) y X un aminoácido cualquiera (Rodríguez et al., 2001). El motivo consenso adopta una conformación extendida en la cual la lisina aceptora se sitúa dentro de un surco hidrofóbico. Los residuos adyacentes interactúan directamente con Ubc9 estableciendo puentes de hidrógeno y uniones electrostáticas que facilitan el reconocimiento del motivo consenso (Bernier-Villamor et al., 2002; Lin et al., 2002; Sampson et al., 2001).

Se han identificado motivos de reconocimiento adicionales que se resumen en la Tabla II.2.1.3 (Hietakangas et al., 2006; Matic et al., 2010; Peurala et al., 2012; Yang et al., 2006; Yang y Gregoire, 2006). Entre estos motivos se incluyen los motivos de SUMOilación dependientes de fosforilación (PDSMs por sus siglas en inglés) y los motivos de SUMOilación dependientes de aminoácidos negativos (NDSMs por sus siglas en inglés) que incrementan la conjugación por SUMO al facilitar la interacción con Ubc9 (Mohideen et al., 2009).

Motivo	Secuencia consenso	Mecanismo regulatorio
Motivo consenso	$\psi KX(E/D)$	-
Motivo consenso invertido	$(E/D)XK\psi$	-
Motivo consenso hidrofóbico	$\psi\psi\psi KX(E/D)$	-
Motivo de SUMOilación dependiente de fosforilación (PDSM).	$\psi KX(E/D)XX(pS)P$	Fosforilación por quinasas dirigidas por prolina
Motivo de SUMOilación dependiente de aminoácidos con carga negativa (NDSM)	$\psi KX(E/D)XXEEEE$	-
Motivo de SUMOilación fosforilado (pSuM)	$\psi KX(pS)P$	Fosforilación por quinasas dirigidas por prolina
pSuM extendido	$\psi KX(pS)P(pS)XXX(pS)P$	Fosforilación por quinasas dirigidas por prolina y GSK3

Tabla II.2.1.3. Motivos de reconocimiento de SUMO. Adaptado de Flotho y Melchior (2013).

SUMO puede ser conjugado covalentemente a proteínas que contienen **motivos de interacción con SUMO (SIM)** por sus siglas en inglés (Minty et al., 2000). Los SIMs se caracterizan por la presencia de aminoácidos hidrofóbicos –típicamente (V/I)-X-(V/I)-(V/I) o (V/I)-(V/I)-X(V/I)– flanqueados en su extremo N- o C-terminal por residuos de serina (susceptibles de ser fosforilados) y/o por un grupo de aminoácidos ácidos (Hecker et al., 2006; Song et al., 2004; Song et al., 2005). Este motivo forma una hoja plegada β corta que queda embebida en un surco formado por hélices α y hojas plegadas β 2. Dependiendo de la naturaleza exacta del motivo SIM, la orientación relativa a las hojas plegadas β 2 de SUMO puede ser paralela o anti-paralela (Hecker et al., 2006) (Figura II.2.4). No obstante, el grado de afinidad entre SUMO y el motivo SIM es bajo y se sitúa en el rango micromolar.

El motivo SIM facilita la SUMOilación o media la unión a proteínas SUMOiladas y se ha encontrado en un amplio abanico de proteínas que incluye sustratos de SUMO y enzimas implicadas en el proceso de SUMOilación (Perry et al., 2008; Song et al., 2004; Song et al., 2005). Ejemplos de SUMOilación dependiente de SIM incluyen al co-represor transcripcional Daxx, USP25, la helicasa BLM, las E3 SUMO-ligasas RanBP2, Siz1/PIAS y Pc2 (Chang et al., 2011; Meulmeester et al., 2008; Tatham et al., 2005; Yang y Sharrocks, 2009; Yunus y Lima, 2009; Zhu et al., 2008).

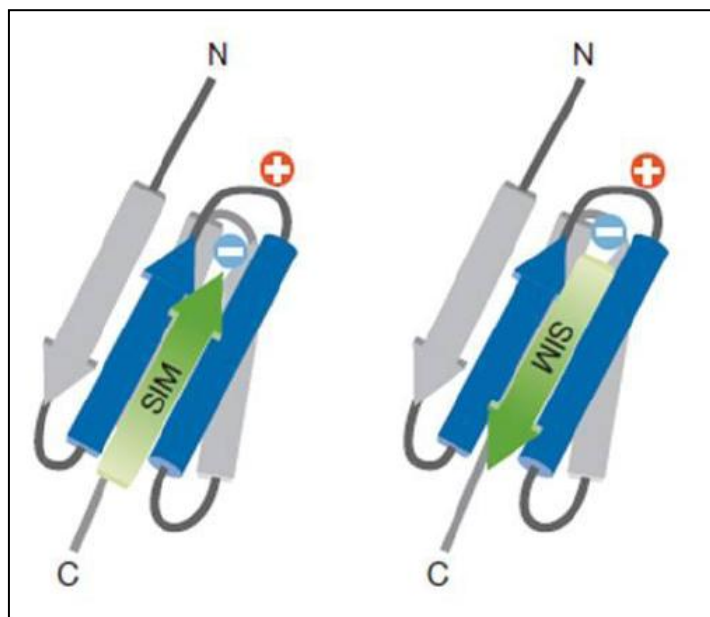


Figura II.2.1.4. Modelo de interacción entre SUMO1 (azul) y SIM (verde). La inserción del SIM en el surco hidrofóbico de SUMO1 puede darse en dos orientaciones dependiendo de la disposición de los aminoácidos hidrofóbicos y cargados de ambas proteínas. Adaptado de Kerscher (2007).

II.2.2 Consecuencias de la SUMOilación: relación con la cascada de hipoxia

Las consecuencias de la SUMOilación son variadas e incluyen cambios conformacionales, de localización celular, en la actividad y/o estabilidad de la proteína diana o pérdida de unión a otras proteínas (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). La detección y análisis de la SUMOilación se ve dificultada por los bajos niveles de modificación basal y la actividad isopeptidasa. Por ello, las primeras dianas en ser identificadas fueron aquellas muy abundantes o estables como RanGAP1, PML o Sp100 (Kamitani et al., 1998; Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996; Müller et al., 1998; Sternsdorf et al., 1999). Gracias a la mejora de las técnicas de detección, se ha podido identificar substratos poco abundantes que, en conjunto, han permitido determinar que la SUMOilación regula prácticamente todos los aspectos de la biología celular. En *Schizosaccharomyces pombe* y *Aspergillus nidulans* la inactivación de SUMO es letal (Tanaka et al., 1999; Wong et al., 2008). Sin embargo, en humanos y ratones, la haploinsuficiencia de SUMO1 es mayoritariamente compensada por SUMO2/3 aunque su carencia provoca defectos en el desarrollo del corazón o labio leporino (Alkuraya et al., 2006; Evdokimov et al., 2008; Zhang et al., 2008). La inactivación de *Ubc9* y *Senp1* o *Senp2* en ratones es letal debido a la disminución o incremento de la modificación por SUMO, respectivamente (Cheng et al., 2007; Chiu et al., 2008; Nacerddine et al., 2005).

La SUMOilación es un mecanismo clave en la protección de las células frente a estrés metabólico o factores ambientales adversos como cambios en la presión osmótica, temperatura ambiente, estado oxidativo, radiación ionizante o estrés genotóxico que causan un incremento notable en la conjugación de SUMO en múltiples tipos celulares (Comerford et al., 2003; Golebiowski et al., 2009; Manza et al., 2004; Saitoh y Hinchey, 2000). En este sentido, es destacable el papel de SUMO en la respuesta a daño en el ADN modificando proteínas como PCNA, BLM, XRCC4 y RPA de mamíferos o SGS1, YKU70 y RAD52 en levaduras (Branzei et al., 2006; Dou et al., 2010; Eladad et al., 2005; Hoegge et al., 2002; Sacher et al., 2006; Yurchenko et al., 2006; Zhao y Blobel, 2005). SUMO es un regulador de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés) y de la homeostasis del retículo endoplásmico (RE). La deficiencia en *SENP1* promueve la apoptosis celular inducida por ERE. SUMO1 y SUMO2/3 modifican XBP1 reduciendo su actividad transcripcional y su deSUMOilación por *SENP1* es esencial para promover su función en la respuesta UPR (Golebiowski et al., 2009; Jiang et al., 2012).

Acorde con estos datos, son muchas las evidencias que indican que SUMO media la adaptación a hipoxia. Durante la hibernación, el flujo sanguíneo, el consumo de energía y la temperatura corporal disminuyen sin causar daño cerebral. El hecho de que bajo estas condiciones, la SUMOilación se halle incrementada sugiere que SUMO protege a las células frente a niveles normalmente letales de oxígeno y glucosa (Lee et al., 2007). Estudios *in vivo* parecen apoyar esta hipótesis. Ratones expuestos a hipoxia muestran un incremento en los niveles de ARNm y de proteína de SUMO1 en cerebro y corazón (Comerford et al., 2003; Shao et al., 2004). Asimismo, varios modelos de isquemia cerebral global o focal muestran un incremento en el proceso de SUMOilación tanto por SUMO1 como por SUMO2/3 (Cimarosti et al., 2008; Yang et al., 2008a; Yang et al., 2008b). Recientemente se ha descrito que la isquemia transitoria en neuronas de la médula espinal induce un incremento en la conjugación por SUMO2/3 (Wang et al., 2012) y que el silenciamiento de SUMO1 y SUMO2/3 en neuronas corticales de ratas disminuye la viabilidad celular después de la privación de oxígeno y glucosa (OGD por sus siglas en inglés) (Datwyler et al., 2011). De manera similar, la sobre-expresión de *SENP1* en neuronas del hipocampo disminuye la conjugación por SUMO1 y SUMO2/3 e incrementa la muerte celular dependiente de OGD (Cimarosti et al., 2012). La pérdida de *SENP3* podría mediar la conjugación de SUMO2/3 en células expuestas a OGD (Guo et al., 2013).

Numerosos componentes de la cascada de señalización de hipoxia sufren modificación por SUMO (Núñez-O'Mara y Berra, 2013). Se ha propuesto que la SUMOilación de HIF-1 α promueve su interacción con pVHL y su degradación (Cheng et al., 2007). Así, ratones deficientes en *Senp1* mueren debido a una anemia severa consecuencia de un defecto en la estabilización de HIF-1 α . Por el contrario, algunos autores sostienen que la SUMOilación de HIF-1 α induce su estabilización y actividad transcripcional (Bae et al., 2004; Carbia-Nagashima et al., 2007). Por último, Berta y colaboradores (2007) sugieren que la SUMOilación de HIF-1 α reprime su actividad transcripcional sin afectar a su estabilidad. Además, se ha

descrito que la SUMOilación de pVHL se halla incrementada en hipoxia e inhibe su actividad E3 ubiquitina-ligasa y por ende, la degradación de HIF-1 α (Cai et al., 2010; Cai y Robertson, 2010). Asimismo, HIF-2 α e HIF-1 β son modificados por SUMO1 y/o SUMO2/3 disminuyendo su estabilidad y actividad (Tojo et al., 2002; van Hagen et al., 2010). La conjugación de SUMO a p300 y CBP disminuye su actividad transactivadora (Girdwood et al., 2003; Kuo et al., 2005). Por último, GLUT1 y GLUT4 son sustratos de SUMO y la sobre-expresión de SUMO1 se ha relacionado con un incremento en la captación de glucosa en la célula y con un incremento en la glicolisis (Agbor et al., 2011; Giorgino et al., 2000). Todos estos datos evidencian el papel que SUMO juega en la homeostasis del oxígeno, proceso en el que las PHDs son esenciales.

III.Objetivos

Inicialmente identificadas como los «sensores» de oxígeno, las PHDs son enzimas claves en la regulación de su homeostasis. Cada una de ellas presenta, sin embargo, diferentes particularidades en su localización, distribución y regulación. Además, estos últimos años estamos asistiendo al descubrimiento de nuevas dianas moleculares y vías de señalización que subrayan su idiosincrasia.

Las modificaciones post-traduccionales de las proteínas son altamente dinámicas y en su mayoría reversibles. Por ello, desencadenan respuestas celulares ágiles y confieren una gran plasticidad a las proteínas modificadas. El estudio del papel de las PTMs en la regulación de las PHDs es un área de investigación escasamente explorada que suscitó el interés de nuestro laboratorio. En concreto, en el presente trabajo se estudió la modificación por SUMO. Con el fin de evaluar dicha hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Determinar si PHD1 es sustrato de SUMO.
- 2) Estudiar los mecanismos moleculares implicados en la SUMOilación de PHD1 y analizar la relevancia fisiopatológica de dicha SUMOilación.
- 3) Profundizar en el estudio de la SUMOilación de PHD3.

IV. Materiales y Métodos

IV.1 Biología Molecular

IV.1.1 Construcciones

Los constructos **pCMV-Myc-HIF1 α -DM (P402/564A)**, **Myc-HIF1 α -DM⁶⁵⁷**, **pcDNA3-HA-PHD1-WT**, **pcDNA3-HA-PHD3-WT**, **pcDNA4-HA-PHD3-H196A**, **pcDNA4-HA-PHD3- Δ SUMO**, **pcDNA4-HA-PHD3-SUMO2/3**, **CMV- β galactosidasa**, **NF κ B-LUC**, **SV40- β galactosidasa** y **pRE- Δ tk-Luc-HRE** (que contiene tres copias del *Hypoxia Response Element* del gen de la eritropoyetina) se han descrito previamente (Berra et al., 2003; Ginouvès et al., 2008; Núñez-O'Mara et al., 2015).

Los plásmidos **Myc-ATF4** y **pATFx2-LUC** fueron donados por la Dra. D. Katschinski (Herz Zentrum, Göttingen, Alemania). El grupo del Dr. MS. Rodríguez (Inbiomed, San Sebastián, España) nos cedió cortésmente los plásmidos **pcDNA3-SUMO2/3(His)₆** y **pcDNA3-UBC9-V5**. La Dra. T. Borsello (Istituto Di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milan, Italia) nos ofreció el plásmido **pEGFP-C1-SENP1**. Finalmente, los plásmidos **mRUBY2-PHD1-WT** y **mRUBY2-PHD1-K118/120R** se generaron en el laboratorio de la Dra. V. Sée (Universidad de Liverpool, Reino Unido).

La construcción **pcDNA3-HA-PHD1-Nter** se generó por amplificación por PCR utilizando el plásmido HA-PHD1-WT como molde y los oligos 5'-CTCCCTCGGATCCGACAGCCCGTG-3' (sentido) y 5'-GCCGTAGAATTCCAGCAGGGCACGATATAG-3' (antisentido) que contienen los sitios de digestión para BamHI y EcoRI (Takara), respectivamente. El producto de PCR digerido con estas enzimas se migró en un gel de agarosa, se purificó y ligó en el vector pcDNA3-HA previamente digerido con las enzimas BamHI y NotI. La construcción **pcDNA3-HA-PHD1-Cter** se generó de idéntica manera empleando los oligos 5'-CAGTGCTGGATCCATGGAGGAGGCG-3' (sentido) y 5'-CTGCAGAATTCCTAGGTGGGCGTAGG-3' (antisentido).

pBind-HIF-ODDD-DM se generó por amplificación por PCR empleando como molde pCMV-Myc-HIF1 α -DM (P402/564A) con los oligos 5'-GGATCCCAGGTATTATTCAGCACGACTTG-3' (sentido) y 5'-GGTACCTCAATAGGGAGCTAACATCTCCA-3' (antisentido) que contiene los sitios de digestión para BamHI y KpnI. El producto de PCR digerido con estas enzimas se migró en un gel de agarosa, se purificó y se ligó con el vector pBIND previamente digerido con las mismas enzimas.

Se empleó *In-Fusion[®]HD Cloning* (Clontech) para clonar PHD1-WT y PHD1- Δ SUMO en el vector Myc-Clover-pCMV-Tag3B por PCR con los oligos 5'-GACGAGCTGTACAAGGGATCCGACAGCCCGTGCCAGCCGAG-3' (sentido) y 5'-TTAATTAAGGTACCGCTAGGTGGGCGTAGGCGGCTG-3' (antisentido). Se generaron así las construcciones **GFP-PHD1-WT** y **GFP-PHD1- Δ SUMO**.

Todos los plásmidos se amplificaron utilizando las bacterias ultracompetentes XL10-Gold y se purificaron mediante el *kit* de maxiprep (QIAGEN). Los ADNs amplificados se verificaron por digestión enzimática y secuenciación (Stabvida).

IV.1.2 Mutagénesis

Los plásmidos **pcDNA3-HA-PHD1-K118/120R** y **HA-PHD1-K361R** se obtuvieron por mutagénesis dirigida utilizando el *kit QuickChange IIXL Site directed Mutagenesis kit* (Stratagene) a partir del plásmido pcDNA3-HA-PHD1-WT y utilizando los oligos que se indican en la Tabla IV.1.2. El mutante **pcDNA3-HA-PHD1-K118/120/361R** se obtuvo a partir del plásmido pcDNA3-HA-PHD1-K118/120R mutando la lisina K361.

Con objeto de obtener una construcción de PHD1 catalíticamente inactiva, se generó el mutante **pcDNA3-PHD1-H358A**. Para ello, se reemplazó la H358 del sitio catalítico de PHD1 por una alanina utilizando como molde pcDNA3-HA-PHD1-WT y los oligos que se indican en la Tabla IV.1.2

El mutante **pcDNA3-PHD1-SIMmut** se obtuvo por mutación de dos leucinas por alaninas comprendidas en el motivo SIM putativo de PHD1 (Tabla IV.1.2).

El mutante **Myc-HIF2 α -DM (P405/531A)** se obtuvo por la mutación de las prolinas 405 y 531 a alaninas en dos ciclos de mutagénesis consecutivas a partir del plásmido Myc-HIF2 α -WT (Tabla IV.1.2).

Todos los mutantes se corroboraron por digestión enzimática y secuenciación (Stabvida).

Construcción	Oligo sense	Mutación silenciosa
HA-PHD1-K118/120R	5'-CCTGAGGCCCCCA G ACGGAG G ATGGGCCGAGGAT-3'	
HA-PHD1-K361R	5'-CCCCACGAGGTGA G GCCTGCCTATGCCACC-3'	Nuevo sitio StuI
HA-PHD1-H358A	5'-GTCTGACCGGCGGAACCC TG CAGAGGTGAAGCCAGCC-3'	Nuevo sitio PstI
HA-PHD1-SIMmut	5'-GACGTTAAGGTGCATGGCGGC GCG GCGCA A ATCTTCCCTGAGGGC-3'	Eliminación sitio Bgl II
HIF2 α -P405A	5'-GAGGAGCTGGCCCAGCT A GCT G CCACCCAGGAGACGCC-3'	Nuevo sitio NheI
HIF2 α -P531A	5'-CAATGAGCTGGGAC CTC GAGACTGGCA G CCATATCCCCATG-3'	Nuevo sitio XhoI

Tabla IV.1.2. Oligos utilizados en las mutagénesis indicadas. En rojo se muestra la mutación de interés y en azul la mutación silenciosa que introduce o elimina un sitio de restricción.

IV.1.3 RT-qPCR

El ARN total se purificó siguiendo las indicaciones del *kit* comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) y se cuantificó en nano-drop. Para comprobar la calidad del ARN, se migraron 0.5µg con EtBr (10mg/mL) en un gel de agarosa al 1% y 36.5% de paraformaldehído y se analizaron las bandas de ARN 18S y 28S en un transiluminador de UV. Posteriormente, se retrotranscribió 1µg de ARN con el *kit* *Kit Omniscript* (Qiagen) según las recomendaciones del fabricante en un termociclador (5 min 25°C / 30 min 42°C / 5 min 85°C / 4°C).

Se amplificaron 50ng de cada muestra de ADNc utilizando los oligos correspondientes a cada gen (indicados en la Tabla IV.1.3) y *FastStart Universal SYBR GreenMaster* (Roche) ajustando a 10µL de volumen final con agua libre de ARNasas (SIGMA W4502). La qPCR se realizó en el termociclador CFX96 (Bio-Rad) según el siguiente protocolo: 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C y una etapa final de disociación. Para cada amplificación se incluyó un control sin ADNc. Los niveles de RNA se calcularon por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando *RPLP0* como control interno para la normalización.

Primers	Sense	Secuencia	Condiciones de uso (µM)
<i>RPLP0</i>	Sentido	5'-CAGATTGGCTACCCAACCTGTT-3'	0.3
	Antisentido	5'-GGCCAGGACTCGTTTGTACC-3'	0.3
<i>CA9</i>	Sentido	5'-GAAAACAGTGCCTATGAGCAGTTG-3'	0.4
	Antisentido	5'-TCCTGGGACCTGAGTCTCTGA-3'	0.4
<i>GLUT1</i>	Sentido	5'-GGTTGTGCCATACTCATGACC-3'	0.3
	Antisentido	5'-CAGATAGGACATCCAGGGTAGC-3'	0.3

Tabla IV.1.3. Secuencia de los oligos empleados en la amplificación por RT-qPCR de los genes indicados y condiciones de uso.

IV.2 Biología Celular

IV.2.1 Cultivos celulares y tratamientos

En la presente tesis se emplearon las siguientes líneas celulares:

- **HeLa:** Células epiteliales humanas derivadas de carcinoma de cérvix.

- **HEK293T**: Células generadas por transformación de células embrionarias de riñón humano.
- **T47D**: Células derivadas de un carcinoma ductal de mama ER(+).

Las líneas celulares HeLa y HEK293T se crecieron en medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco, DMEM (*high glucose*, GlutaMAX-1 y piruvato de sodio) suplementado con un 10% o un 5% (v/v) de suero fetal bovino (GIBCO) previamente inactivado (30 minutos a 56°C), respectivamente. La línea celular T47D se creció en medio DMEM/F12 (*high glucose*, GlutaMAX-1, piruvato sódico) suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (GIBCO) previamente inactivado. Las condiciones de incubación de las células fueron: 37°C a un 95% de humedad y atmósfera de CO₂ al 5%.

El procedimiento empleado para levantar las células fue el siguiente: lavado con PBS 1x (GIBCO) e incubación en tripsina (0.05%, GIBCO) que se neutralizó con dos volúmenes de medio de cultivo. Finalmente, las células se colectaron por centrifugación (1.200rpm durante 5 minutos a RT) y se resuspendieron en el medio correspondiente. El número de pases de las células se controló estrictamente en función de la línea celular, no superando en ningún caso los 20 ó 30 pases. También se verificó mensualmente la ausencia de micoplasmas en los cultivos (Myco-Alert-Cambrex).

El conteo del número de células viables (exclusión de *Trypan Blue* 0.4%) se realizó en una cámara de *Neubauer* visualizado a través de un microscopio de luz visible (objetivo de 10x).

Utilizamos diferentes placas para sembrar las células. En los experimentos de inmunofluorescencia, las células HeLa fueron plaqueadas sobre cubreobjetos (15mm, Thermo Scientific).

Para el tratamiento de **hipoxia**, las células se incubaron en una cámara de hipoxia (In vivo² 400, Ruskinn, Life Sciences) manteniendo una concentración de O₂ del 1% gracias a una mezcla de gases que contiene un 5% de CO₂ y nitrógeno. Las células HEK293T sometidas a cinéticas largas de hipoxia, de más de 24 horas, se cultivaron en medio DMEM 10% FBS suplementado con 20mM HEPES y ampicilina/estreptomicina. Los pases, las siembras y las transfecciones bajo estas condiciones se realizaron en el interior de la cámara de hipoxia, de tal manera que la confluencia no sobrepasara el 80% en el momento de la lisis. Se emplearon controles visuales en los pasos de pase, siembra, transfección y lisis para monitorizar las células introducidas en la cámara de hipoxia.

Como inhibidor de la actividad hidroxilasa se empleó **DMOG** (Cayman Chemical) a 1mM durante 4 horas. La **ciclohexemida** (SIGMA-ALDRICH) se empleó a 20µg/mL como inhibidor de la síntesis proteica, durante los tiempos indicados en los pies de figura correspondientes. El **MG132** (SIGMA-ALDRICH) se utilizó como inhibidor del proteasoma a 10µM durante 4 horas. Las células HEK293T y HeLa se trataron con 20ng/mL de **TNFα** humano (PeproTech) para inducir la actividad de NF-κB durante 16 horas. Para inhibir el

exporte nuclear, las células HeLa fueron tratadas con **Leptomomicina-B** (SIGMA-ALDRICH) a 10ng/mL. Se empleó la **tapsigargina** (SIGMA-ALDRICH) como inductor de estrés del retículo endoplasmático a 300nM.

IV.2.2 Transfecciones

Las células fueron transfectadas a una confluencia del 60-70% transcurridas 24 horas desde la siembra. La cantidad de ADN a transfectar así como el tiempo de incubación de la transfección fueron variables y se indican en la leyenda de cada una de las figuras. Como agentes de transfección se emplearon FuGENE6 (Roche) y Lipofectamina 2000 (Invitrogen).

IV.2.3 Silenciamiento génico

Las baterías de shRNAs empleados son de Open Biosystems y se transfectaron con Arrest-IN (Open Biosystems) siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras 48 horas de expresión y según el experimento, indicado en la leyenda de la figura, las células fueron seleccionadas con 3µg/mL de puromicina (SIGMA), tal y como se indica en la leyenda de las figuras.

IV.2.4 Preparación de los extractos

Se utilizó 200µL (placas 35mm) de tampón Laemmli (50mM Tris HCl pH=6.8, 1.25% SDS, 15% glicerol) en la preparación de **los extractos celulares totales**. La concentración de proteína total se determinó por Lowry (BIORAD) siguiendo el protocolo del fabricante.

Las células destinadas a ser incubadas con la resina de níquel se lisaron en **condiciones desnaturalizantes** con 5mL (placas de 100mm) de tampón 6M guanidinio, 0.1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.01M Tris-HCl pH=8. Los extractos se sonicaron durante 15 segundos (10 microns, Soniprep 150, MSE (UK) Ltd) y se centrifugaron durante 15 minutos a 3.000rpm. El sobrenadante se incubó con la resina de níquel tal y como se indica posteriormente.

Para los **ensayos luciferasa**, las células se lisaron con 100µL (placas de 48 pocillos) de tampón 25mM Tris Fosfato pH=7.8, 8mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 7.5% Glicerol y 1mM DTT. Antes de ser empleados, los extractos se congelaron durante una hora a -80°C, se descongelaron y se centrifugaron 10 minutos a 10000rpm. El sobrenadante se empleó para medir la actividad luciferasa y β-galactosidasa.

Los extractos destinados a ser **inmunoprecipitados** se lisaron con 5mL (placas de 100mm) con tampón conteniendo 50mM Tris-HCl pH=7.5, 150mM NaCl, 0.5% TX-100, 1mM Na₃VO₄, 50mM NaF, 1mM AEBSF, 40mM de glicerolfosfato y 1µg/µL de leupeptina, pepstatina y aprotinina. Las células se incubaron a 4°C

durante 15 minutos y se centrifugaron otros 15 minutos a 10000rpm a 4°C. El sobrenadante resultante se utilizó en el ensayo de inmunoprecipitación correspondiente.

IV.2.5 Inmunofluorescencias

En los experimentos de inmunofluorescencia se emplearon células HeLa. La fijación de las células se realizó con paraformaldehído al 3% durante 30 minutos a 37°C. Las células fueron permeabilizadas durante cinco minutos a RT con una solución que contiene PBS y Triton X-100 al 0.2%. Posteriormente, las células se lavaron y se bloquearon durante 30 minutos a RT con una solución que contiene PBS, 0.2% de gelatina y 2% de albúmina sérica bovina. A continuación, las células se incubaron en una cámara húmeda durante dos horas a RT con el anticuerpo anti-HA (generado en ratón BAbCO/COVANCE, ref MMS-101R) diluido en solución de bloqueo (1:10000). Tras los correspondientes lavados con PBS, los cubres se incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a **Alexa Fluor 488** (Invitrogen, ref: A21202) o **Alexa Fluor 594** (Invitrogen, ref: A21203) diluido en solución de bloqueo (1:1000). Finalmente, los cubres se incubaron en **DAPI** (SIGMA, ref D9542) diluido en solución de bloqueo (1:1000) durante 15 minutos y se fijaron sobre portaobjetos (MENZEL-GLÄSER) utilizando fluoromount (SIGMA, ref F4680). Las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia **Axio Imager D1 (ZEISS)**, con el objetivo 40x o utilizando el accesorio de iluminación estructurada (Apotome) con el objetivo 63x. Las imágenes se capturaron con una cámara AxioCam HRm (ZEISS) operada por el software AxioVision Rel 4.8.

IV.2.6 Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

Para conseguir el fotoblanqueo completo del fluoróforo, los núcleos de células HeLa de interés se fotoblanquearon con un láser de alta densidad a 561nm y 100% de potencia (LSM 510, Zeiss). Con el objetivo de inmersión en aceite 63x se tomaron series de tres fotografías de la región de interés. Asimismo, y con el fin de seguir la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo, se tomaron series de 15 imágenes cada tres minutos de la misma región. Las imágenes se capturaron con el *Photon-Multiplier Tube detector* (PMT) del microscopio operado con el software Zeiss LSM Image Browser.

IV.3 Bioquímica

IV.3.1 Western Blot (WB)

A las muestras preparadas según lo indicado en los pies de figura, se les añadió un 5% de β -mercaptoetanol y azul de bromofenol y se calentaron cinco minutos a 95°C. Posteriormente, las proteínas

se resolvieron en geles de acrilamida SDS-PAGE (7.5%, 10% o del 12%) y se transfirieron por electroforesis húmeda a una membrana de PVDF (Millipore) a 4°C.

Para comprobar la eficacia de la transferencia, las membranas se tiñeron (5 minutos a RT) con Amidoblack (solución acuosa de 25% de isopropanol, 20% de ácido acético y 0.1% de amidoblack) y posterior lavado (10 minutos a RT) en una solución acuosa (25% isopropanol y 10% ácido acético) y otros 10 minutos a RT con una solución de etanol al 96%. Finalmente, las membranas se secaron sobre papel Whatman.

Tras su activación con etanol al 96%, las membranas se rehidrataron mediante lavados sucesivos (2 x 5 min) con tampón TNT (50mM Tris pH=7.4, 150mM NaCl, 0.1% TX-100) y TN (1 x 5 min) (50mM Tris pH=7.4, 150mM NaCl). A continuación, se bloquearon una hora a RT con tampón TN y un 5% de leche. Posteriormente, se incubaron las membranas con anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Las diluciones de los anticuerpos utilizados se indican en la Tabla IV.3.1. Al día siguiente, las membranas se lavaron sucesivamente con tampón TNT (3 x 10 min) y tampón TN (1 x 10 min) y se re-bloquearon 10 minutos con solución de bloqueo. Las membranas se incubaron durante una hora a RT con los anticuerpos secundarios también diluidos en solución de bloqueo y posteriormente se volvieron a lavar sucesivamente con TNT y TN. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron mediante diferentes exposiciones con películas fotosensibles (Amersham HyperfilmTM ECL, GEHealthcare) tras un minuto de exposición a solución ECL (mezcla 1:1) de la solución 1) 0.5M Tris pH=8.5, 0.4mM ácido cumárico y 2.5mM luminol y 2) 0.5M Tris pH=8.5 y 0.02% H₂O₂.

Anticuerpo (origen)	Dilución	Referencia
Anti-βactina (ratón)	1:50000	A5441 (SIGMA)
Anti-Cyclin D1 (ratón)	1:500	sc-8396 (Santa Cruz)
Anti-ER (ratón)	1:1000	6F11, NCL_L_ER (Novacastra)
Anti-GFP (ratón)	1:1000	11814460001 (Roche)
Anti-HA (ratón)	1:1000	MMS-101R (COVANCE)
Anti-HIF1α 2087 (conejo)	1:5000	Anticuerpo casero (Richard et al., 1999)
Anti-HIF-2α (conejo)	1:5000	NB100-122 (Novus)
Anti-(His) ₆ (ratón)	1:1000	70796-3 (Novagen)
Anti-Myc (ratón)	1:1000	22765 (Cell Signaling)
Anti-PR (ratón)	1:1000	16, NCL_PCR_312 (Novacastra)
Anti-S6 (ratón)	1:1000	2317 (Cell Signaling)
Anti-S6-P (conejo)	1:1000	2211 (Cell Signaling)
Anti-S6K (conejo)	1:1000	9202 (Cell Signaling)

Anti-S6K-P (ratón)	1:1000	9208 (Cell Signaling)
Anti-V5 (ratón)	1:10000	R960-25 (Invitrogen)
Anti-ratón-HRP	1:10000	W402B (Promega)
Anti-conejo-HRP	1:5000	W401B (Promega)

Tabla IV.3.1. Anticuerpos, diluciones utilizadas para los Western Blots y referencias de los mismos.

IV.3.2 Ensayos Luciferasa

Se utilizó el kit comercial *Steadylite plus™ High Sensitive Luminescence Reporter Gene Assay System* (PerkinElmer) para medir la actividad luciferasa. Para ello, se cargaron 20µL de muestra en placas de 96 pocillos opacas (Optiplate 96 white, Perkin Elmer) y se agregaron 40µL de substrato (*Steadylite plus substrate solution*, PerkinElmer) y 50µL de PBS 1x. La mezcla se incubó 15 minutos a RT protegida de la luz y posteriormente se midió la actividad luciferasa utilizando un luminómetro (Veritas Microplate Luminometer, Turner Biosystems) bajo el control del software Veritas 1.3.1.

En paralelo, se midió la actividad β-galactosidasa como normalizador de la transfección utilizando el kit comercial *Galacto-light Plus system* (Applied Biosystems). Con dicha finalidad, se cargaron 10µL de muestra en placas de 96 pocillos opacas (Optiplate 96 white, Perkin Elmer) y se agregaron 50µL de una mezcla conteniendo *Galacto reagent* diluido (1:100) en tampón de dilución (Applied Biosystems). La mezcla se incubó una hora a RT protegida de la luz, tras lo cual se le agregó 75µL de *Acclerator* (Applied Biosystems), se incubó otros 15 minutos a RT y se midió la actividad β-galactosidasa utilizando el mismo luminómetro. La actividad luciferasa se expresó como el valor relativo (luciferasa/β-galactosidasa).

IV.3.3 Purificación por Resina de Níquel

Utilizamos 30µL de resina de níquel por condición (Nickel-NTA Agarose, QUIAGEN). Esta resina se lavó con PBS 1x y se bloqueó con PBS 1x + 0.05% de albúmina sérica bovina a RT durante toda la noche. La resina se lavó posteriormente con PBS 1x (5 x 1mL) y tampón de lisis (1 x 1mL). A continuación, se añadió a la resina los extractos celulares y β-mercaptoetanol (10mM) y se incubaron durante dos horas y media a RT con agitación. La mezcla resina-extractos celulares se centrifugó durante cinco minutos a 3000rpm y se lavó consecutivamente por centrifugación con 5mL de tampón de lisis (3000rpm, 2 minutos a RT), 3 x 5mL con tampón de urea (8M Urea, 0.1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.01M Tris-HCl y 10mM β-mercaptoetanol) a pH= 8.0 y 3 x 5mL del mismo tampón equilibrado a pH= 6.3. Tras los lavados, se añadió 50µL de tampón de elución 3x (150mM Tris HCl pH=6.8, 6% SDS, 30% glicerol, 10% β-mercaptoetanol, azul de bromofenol) conteniendo Imidazol 200mM durante una hora y media a 37°C. Posteriormente, las muestras se incubaron 5 minutos a

95°C y se centrifugaron 5 minutos a 10000rpm. Se retiró el sobrenadante (eluido) resultante y se resolvió en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

IV.3.4 Inmunoprecipitación (IP)

Se realizó un *crosslinking* entre los anticuerpos empleados y la resina de proteína A/G-sefarosa (según se indica en la Tabla IV.3.4). Para ello, la resina-anticuerpo se incubó en PBS en una noria, se lavó con tampón de borato de sodio (200mM borato, 3M NaCl pH=9) y se incubó con dimetilpimelidato 40mM disuelto en el mismo tampón de borato durante 30 minutos a RT en una noria. A continuación, la resina-anticuerpo se lavó e incubó con etanolamina (200mM) durante dos horas en una noria. Finalmente, tras cuatro lavados por centrifugación (2 minutos a 2500rpm a RT) el producto del *crosslinking* se almacenó a 4°C con PBS 1x + 0.01% de azida hasta su utilización.

Antes de incubar los extractos con el producto del *crosslinking*, la resina-anticuerpo se lavó con tampón de lisis (3 x 1mL, 2500rpm a 4°C). Los extractos celulares en condiciones nativas se incubaron con la correspondiente resina-anticuerpo durante tres horas y media a 4°C en una noria. A continuación, la mezcla se lavó con tampón de lisis (3 x 1mL, 2500 rpm a 4°C) y las proteínas se eluyeron con tampón Laemmli 2x (67mM Tris-HCl pH=6.8, 1.67% SDS y 20% glicerol) tras calentarlas 5 minutos a 95°C y centrifugarlas durante 12 minutos a 13000rpm. Se retiró el sobrenadante (eluido) resultante y se resolvió en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y las bandas inmunoreactivas se detectaron por Western Blot.

ANTICUERPO	REFERENCIA	CROSSLINKING		INMUNOPRECIPITACIÓN	
		Resina (μL)	Anticuerpo (μL)	Resina-Anticuerpo (μL)	Extracto (μg)
Anti-HA	MMS-101R (COVANCE)	Proteína A-Sefarosa (100μl)	12	15	500
Anti-Myc	2276S (Cell Signaling)	Proteína G-Sefarosa (100μL)	30	15	500

Tabla IV.3.4. Condiciones de crosslinking e inmunoprecipitación utilizados.

IV.4 Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Los datos se analizaron utilizando el Test *t* de Student (dos colas) entre dos grupos o ANOVA entre múltiples grupos.

Cuando el nivel de significación (*p*) obtenido en cada test es menor de 0.05, las diferencias obtenidas se consideraron estadísticamente significativas (**p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001).

V.Resultados

V.1 Estudio de la SUMOilación de PHD1

V.1.1 PHD1 es diana de SUMO

La detección *in cellulo* de la modificación por SUMO de proteínas diana no es sencilla. Esto se debe a que únicamente una pequeña fracción de la proteína diana es SUMOilada y a que el proceso de SUMOilación, como ya se mencionó, es un proceso muy dinámico por la actividad de las deSUMOilasas. Por ello, para evaluar la SUMOilación de PHD1 se realizaron ensayos de purificación en condiciones desnaturizantes con una resina de níquel (Chen y Chen, 2003; Lin et al., 2003b). Este sistema *in cellulo* confiere una mayor especificidad que los ensayos *in vitro* tradicionales y facilita la preservación de formas SUMOiladas además de evitar la purificación de interacciones no covalentes.

Así, se transfectaron células HEK293T con HA-PHD1-WT, SUMO2/3(His)₆ con o sin V5-Ubc9. Y es que los niveles de expresión de la enzima E2 de conjugación (Ubc9) pueden resultar limitantes en determinadas circunstancias (Lin et al., 2002). En la Figura V.1.1 se observan dos bandas de alto peso molecular, de aproximadamente 70 y 80 kDa, que destacan claramente al sobre-expresar Ubc9. SUMO tiene una masa de 10 kDa y PHD1 de 50 kDa, de modo que las bandas de alto peso molecular observadas por Western Blot pueden corresponder con la conjugación de dos (banda de 70 kDa) o tres SUMOs (banda de 80 kDa).

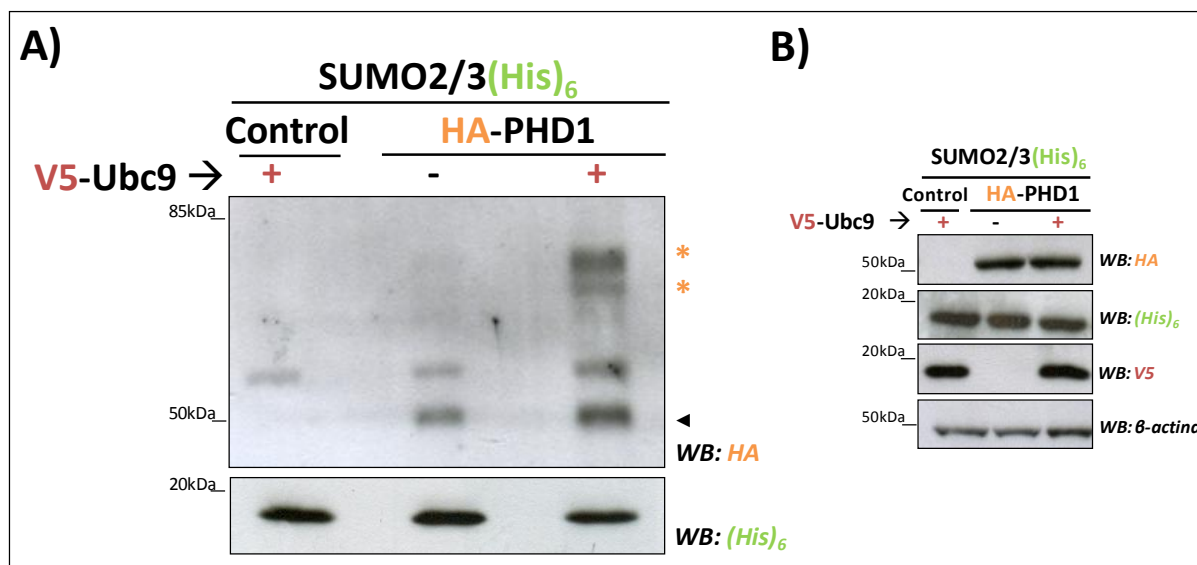


Figura V.1.1. PHD1 es SUMOilado in cellulo y Ubc9 incrementa su SUMOilación. **A)** Células HEK293T se transfectaron, en placas de 100mm, con 3 μ g de HA-PHD1 o un plásmido vacío junto con 12 μ g de SUMO3(His)₆ en presencia o ausencia de V5-Ubc9 (3 μ g). Los extractos se purificaron a las 48 horas con una resina de níquel en condiciones desnaturalizantes y la proteína purificada se visualizó por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-HA y anti-(His)₆. **B)** En paralelo, se analizó la expresión de las proteínas en los extractos totales. (◀) y (*) se corresponden con formas no-modificadas y modificadas de PHD1, respectivamente.

V.1.2 Identificación de los residuos SUMOilables de PHD1

Para estudiar la funcionalidad de los conjugados PHD1-SUMO, es indispensable identificar los residuos diana de dicha modificación. Mediante el uso del servicio GPS-SUMO (*Prediction of SUMOylated Sites & SUMO-binding Motifs Version 2.0*, <http://sumosp.biocuckoo.org>) se analizó la secuencia de PHD1 y se concluyó que carece de un sitio consenso de SUMOilación (ψ KxE) (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). Sin embargo, el análisis comparativo de la secuencia de PHD1 reveló la presencia 9 lisinas conservadas y un posible motivo SIM. Dos de estas lisinas (K120 y K361), no obstante, destacan cuando la búsqueda de sitios de SUMOilación se realiza en condiciones poco astringentes (Figura V.1.2.1) (Zhao et al., 2014).

Mus musculus	MDSPCQPQALNQALPQLPGSVSESLE--SSRARMGVESYLPCPLLPAHHRPGASGEASAG	58
Rattus norvegicus	MDSPCQPQALNQALPQLPGSVSESLE--PSRARMGVESYLPCPLLPSYHRSGASGEASAG	58
Homo sapiens	MDSPCQPQPLSQALPQLPGSSSEPLEPEPGRARMGVESYLPCPLLPSYHCPGVPEASAG	60
Pan troglodytes	MDSPCQPQPLSQALPQLPGSSSEPLEPEPGRARMGVESYLPCPLLPSYHCPGVPEASAG	60
Pongo pygmaeus	MDSPCQPQPLSQALPQLPGSSSEPLEPEPGRARMGVESYLPCPLLPSYHCPGVPEASAG	60
Xenopus laevis	MDRGHQ-QGKCIRSEVHTANLSEAVP-SVQCVGMGVERFQQYPMKASHPTS ^{SDVQ} SSTNSL	58
Consensus	MD Q Q ... SE.: . MGVE : P: ::::	
Mus musculus	NGTPRTT-----ATATTTTASPLREG-----FGGQDGGELWPLQSEGAAA	98
Rattus norvegicus	NGTPRTT-----ATATTTTASPLREG-----FGGQDGGELWPLQSEGAAA	98
Homo sapiens	SGT ^{PR} -----ATATSTTASPLRDG-----FGGQDGGELRPLQSEGAAA	98
Pan troglodytes	SGT ^{PR} -----ATATSTTASPLRDG-----FGGQDGGELRPLQSEGAAA	98
Pongo pygmaeus	SGT ^{PR} -----ATATSTTASPLRDG-----FGGQDGGELRPLQSEGAAA	98
Xenopus laevis	DGVHQCHNHLTSVQIKANVEVSSAEQEEQVALLACPVTTLRAMGLASGMQLVRAAKSGT	118
	.G. : .A. .:S. :: G .GE: ::: ::	
Mus musculus	LVT ^{KE} -----CQRLAAQG-ARPE--AP ^{KRK} WAKDG-----GDAPSPSKRPW	136
Rattus norvegicus	LVT ^{KE} -----CQRLAAQG-ARPE--AP ^{KRK} WAKDG-----GDAPSPSKRPW	136
Homo sapiens	LVT ^{KG} -----CQRLAAQG-ARPE--AP ^{KRK} WAEDG-----GDAPSPSKRPW	136
Pan troglodytes	LVT ^{KG} -----CQRLAAQG-ARPE--AP ^{KRK} WAEDG-----GDAPSPSKRPW	136
Pongo pygmaeus	LVT ^{KG} -----CQRLAAQG-ARPE--AP ^{KRK} WAEDG-----GDAPSPSKRPW	136
Xenopus laevis	VVSRERGFIQEIDN ^{NP} CQEVGIQVNGRTDGFAT ^{KRK} FMENELTEIGV ^{RG} IAPESG ^{PS} VF	178
	:V:: CQ.. Q .R.: A. ^{KRK} : :: G AP... :	
Mus musculus	ARQENQ----EAKGESGMGCD ^S GNSSSSNTSSS ^{GE} ASAR-LREEVQPSAPERLAL	191
Rattus norvegicus	ARQENQ----EAKGESGVGCD ^S GGG---SSNSTHSS ^{GE} ASSR-LREEAQPSAPERLAL	187
Homo sapiens	ARQENQ----EAEREGGMS ^C SCSSG-----SGEASAG-LMEEALPSAPERLAL	179
Pan troglodytes	ARQENQ----EAEREGGMS ^C SCSSG-----SGEASAG-LMEEALPSAPERLAL	179
Pongo pygmaeus	ARQENQ----EAEREGGMS ^C SCSSG-----SGEASAG-LMEEALPSAPERLAL	179
Xenopus laevis	PPMEGKRRKA ^{EV} HEDAHIHQEYSS ^{TR} -----EGQLA ^Q RPVGIKSSAVS ^{PL} RMSL	227
	. E.: E.. : . . .G: : : : .:P R::L	
Mus musculus	DYIVPCMRYYGICV ^K DNFLGAVLGG ^{RV} LAEVEAL ^K WGGRLRDGQ ^{LVS} QRAIP ^{PR} SIRGDQ	251
Rattus norvegicus	DYIVPCMRYYGICV ^K DNFLGAVLGG ^{RV} LAEVEAL ^K WGGRLRDGQ ^{LVS} QRAIP ^{PR} SIRGDQ	247
Homo sapiens	DYIVPCMRYYGICV ^K DSFLGAALGG ^{RV} LAEVEAL ^K RGGR ^{LR} DGQ ^{LVS} QRAIP ^{PR} SIRGDQ	239
Pan troglodytes	DYIVPCMRYYGICV ^K DSFLGAALGG ^{RV} LAEVEAL ^K RGGR ^{LR} DGQ ^{LVS} QRAIP ^{PR} SIRGDQ	239
Pongo pygmaeus	DYIVPCMRYYGICV ^K DSFLGAALGG ^{RV} LAEVEAL ^K RGGR ^{LR} DGQ ^{LVS} QRAIP ^{PR} SIRGDQ	239
Xenopus laevis	DYIVPCITYYGICV ^K DHFLGEALG ^{SR} VLEEVQMLN ^{RS} GKFRD ^{GQ} LVSQRTIP ^{SK} NI ^{RG} DQ	287
	DYIVPC: YYGICV ^K D FLG .LG.RVL EV: L: .G::RDGQ ^{LVS} QR:IP::IRGDQ	
Mus musculus	IAWVEGHEPGCRSIGALMAHVDAVIRHCAGRLGNYVINGRT ^K AMVACYPGNGLGYVR ^{HVD}	311
Rattus norvegicus	IAWVEGHEPGCRSIGALMAHVDAVIRHCAGRLGNYVINGRT ^K AMVACYPGNGLGYVR ^{HVD}	307
Homo sapiens	IAWVEGHEPGCRSIGALMAHVDAVIRHCAGRLG ^{SY} VINGRT ^K AMVACYPGNGLGYVR ^{HVD}	299
Pan troglodytes	IAWVEGHEPGCRSIGALMAHVDAVIRHCAGRLG ^{SY} VINGRT ^K AMVACYPGNGLGYVR ^{HVD}	299
Pongo pygmaeus	IAWVEGHEPGCRSIGALMAHVDAVIRHCAGRLG ^{SY} VINGRT ^K AMVACYPGNGLGYVR ^{HVD}	299
Xenopus laevis	IAWVEGKEPGCENIGALMSKID ^{EV} IMHCNGK ^{MEN} YVINGRT ^K AMVACYPGNMGYVR ^{HVD}	347
	IAWVEG:EPGC..IGALM:::D VI HC G:: .YVINGRT ^K AMVACYPNGG:GYVR ^{HVD}	
Mus musculus	NPHGDGRCITCIYYLNQ ^N WDV ^K VHGG ^{LL} QIFPEGRPVV ^{ANIE} PLFDRLLIFWSDRRN ^{PH}	371
Rattus norvegicus	NPHGDGRCITCIYYLNQ ^N WDV ^K VHGG ^{LL} QIFPEGRPVV ^{ANIE} PLFDRLLIFWSDRRN ^{PH}	367
Homo sapiens	NPHGDGRCITCIYYLNQ ^N WDV ^K VHGG ^{LL} QIFPEGRPVV ^{ANIE} PLFDRLLIFWSDRRN ^{PH}	359
Pan troglodytes	NPHGDGRCITCIYYLNQ ^N WDV ^K VHGG ^{LL} QIFPEGRPVV ^{ANIE} PLFDRLLIFWSDRRN ^{PH}	359
Pongo pygmaeus	NPHGDGRCITCIYYLNQ ^N WDV ^K VHGG ^{LL} QIFPEGRPVV ^{ANIE} PLFDRLLIFWSDRRN ^{PH}	359
Xenopus laevis	NPNRDGRCLTCIYYLNQ ^N WDA ^K VHGG ^{LL} QIFPEGRSVV ^{ANIE} PLFDRLLIFYS ^{DR} RRN ^{PH}	407
	NP: DGRC:TCIYYLNQ ^N WD. ^K VHGG ^{LL} QIFPEGR.VVANIEPLFDRLLIF:SDRRN ^{PH}	
Mus musculus	V ^K PAYAT ^R YAITVWYF ^{DA} K ^E RAAARD ^K YQLASGQ ^K GVQVPVSQPT ^{TPT}	419
Rattus norvegicus	V ^K PAYAT ^R YAITVWYF ^{DA} K ^E RAAARD ^K YQLASGQ ^K GVQVPVSQPT ^{TPT}	415
Homo sapiens	V ^K PAYAT ^R YAITVWYF ^{DA} K ^E RAAA ^{KD} KYQLASGQ ^K GVQVPVSQPT ^{TPT}	407
Pan troglodyte	V ^K PAYAT ^R YAITVWYF ^{DA} K ^E RAAA ^{KD} KYQLASGQ ^K GVQVPVSQPT ^{TPT}	407
Pongo pygmaeus	V ^K PAYAT ^R YAITVWYF ^{DA} K ^E RAAA ^{KD} KYQLASGQ ^K GVQVPVSQPT ^{TPT}	407
Xenopus laevis	V ^K PAFAM ^R YAITVWYF ^{DA} K ^E RAEA ^{KN} KYRLAAGQ ^K G ^I HVPVSCPGTV- 454	

Figura V.1.2.1. Análisis de secuencia de PHD1. Alineamiento múltiple de la secuencia proteica de PHD1 en diferentes especies. Las Ks resaltadas en rojo representan lisinas conservadas. Se ha identificado un posible motivo SIM (verde) en la secuencia de PHD1.

Se generaron formas truncadas de la proteína para facilitar el estudio de la SUMOilación de PHD1: HA-PHD1-N-ter, truncada del extremo C-terminal y que comprende los aminoácidos 1 a 185 donde se localiza K120; y HA-PHD1-C-ter, proteína truncada del extremo N-terminal y que comprende los aminoácidos 166 a 407 donde se sitúa K361 (Figura V.1.2.2). Además, las posibles dianas de SUMO, junto con K118 por su proximidad a K120, se mutaron en dichos constructos (K/R), generándose HA-PHD1-Nter-K118/120R y HA-PHD1-Cter-K361R.

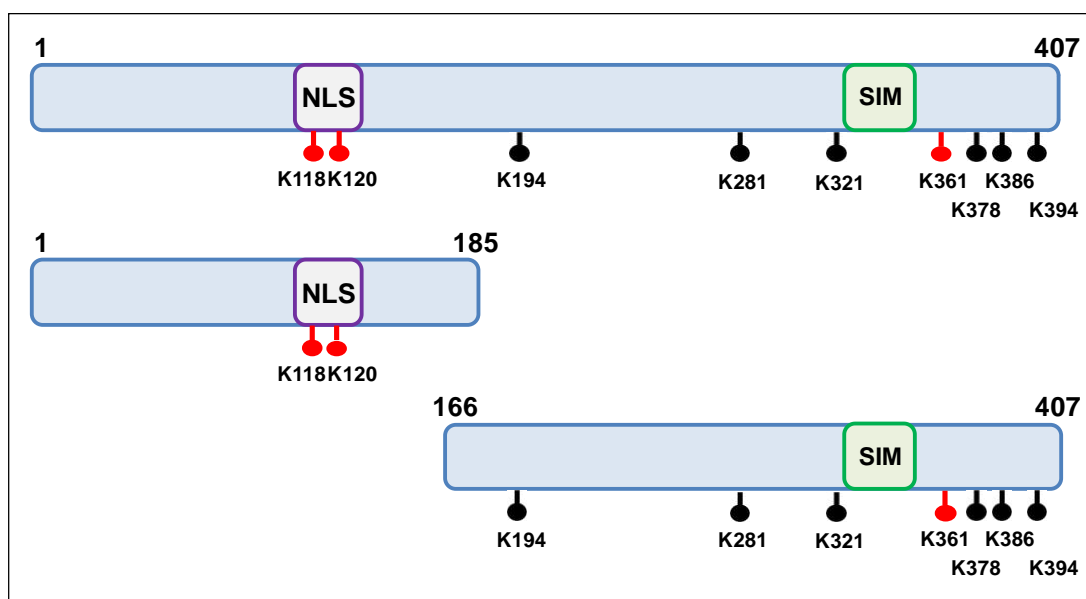


Figura V.1.2.2. Formas truncadas de PHD1. Representación esquemática de las formas truncadas de PHD1: PHD1-Nter (1-185) y PHD1-Cter (166-407). Además, se indican las lisinas conservadas evolutivamente (en rojo las 3 Ks sobre las que se ha centrado nuestro estudio), el SIM identificado y la señal de localización celular (NLS).

Se realizó un ensayo de SUMOilación *in cellulo* de las construcciones descritas. Como se observa en la Figura V.1.2.3, en torno a 50 kDa se distingue, tanto para HA-PHD1-Nter como para HA-PHD1-Cter, una banda muy intensa, que se corresponde con formas SUMO-modificadas. Dichas formas modificadas se reducen notablemente al mutar las Ks 118 y 120 y en menor medida en el caso de la mutación de la K361.

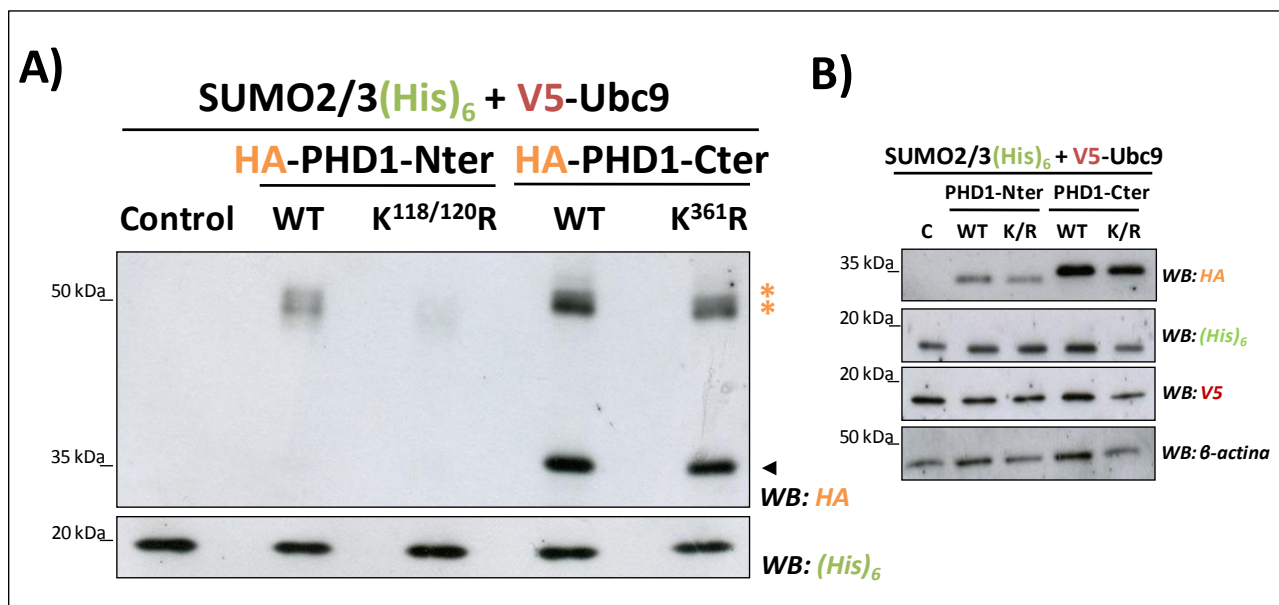


Figura V.1.2.3. Identificación de la región SUMOilable de PHD1. **A)** Células HEK293T se co-transfectaron, en placas de 100mm, con 12µg de SUMO2/3(His)₆, 3µg de V5-Ubc9 y 3µg de HA-PHD1-Nter, HA-PHD1-N-ter-K118/120R, HA-PHD1-Cter y HA-PHD1-C-terK361R o pcDNA3. Los extractos se purificaron a las 48 horas con una resina de níquel en condiciones desnaturalizantes y la proteína purificada se visualizó por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-HA y anti-(His)₆. **B)** En paralelo, se analizó la expresión de las proteínas en los extractos totales. (◀) y (*) se corresponden con formas no-modificadas y modificadas de la proteína, respectivamente.

Las mismas mutaciones se generaron en el contexto de la proteína completa. Asimismo, se generó un mutante triple: HA-PHD1-K118/120/361R. El análisis *in cellulo* de la SUMOilación de los diferentes mutantes arrojó datos muy reveladores. Respecto al patrón correspondiente a las formas PHD1-SUMO conjugadas, la mutación de las lisinas 118 y 120 conlleva la pérdida de la banda superior, mientras que al mutar la K361 desaparece la banda inferior. La mutación de las tres lisinas simultáneamente conlleva la pérdida de ambas bandas y se denominó PHD1-ΔSUMO (Figura V.1.2.4).

Estos resultados sugieren que la banda de alto peso molecular de PHD1-SUMO se corresponde con la SUMOilación sobre las Ks K118 y/o 120 y la banda inferior representa la SUMOilación en la K361.

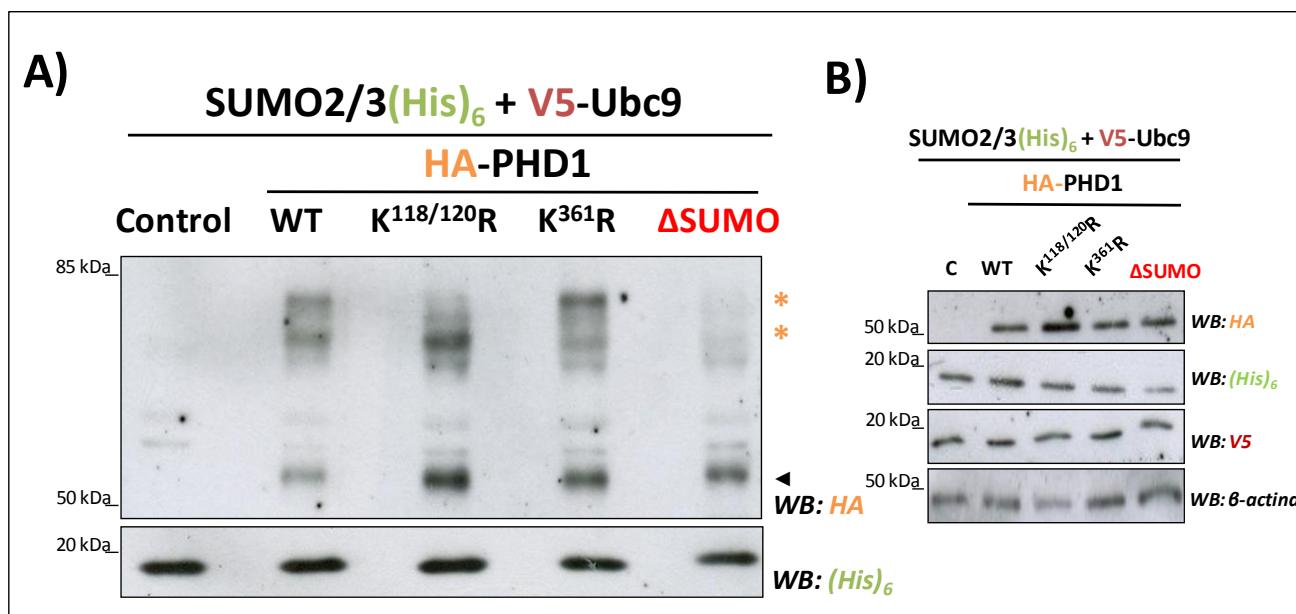


Figura V.1.2.4. Identificación de las lisinas SUMOilables de PHD1. **A)** Células HEK293T se co-transfectaron, en placas de 100mm, con 12µg de SUMO2/3(His)₆, 3µg de V5-Ubc9 y 3 µg de HA-PHD1-WT, HA-PHD1-K118/120R, HA-PHD1-K361R, HA-PHD1-K118/120/361R (ΔSUMO) o pcDNA3. Los extractos se purificaron a las 48 horas con una resina de níquel en condiciones desnaturalizantes y la proteína purificada se visualizó por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-HA y anti-(His)₆. **B)** En paralelo, se analizó la expresión de las proteínas en los extractos totales. (◀) y (*) se corresponden con formas no-modificadas y modificadas de las proteínas, respectivamente.

V.1.3 Estudio del SIM de PHD1

El motivo SIM desempeña un papel esencial en la ruta de SUMOilación actuando como «iniciador» al favorecer la SUMOilación y/o en el devenir de las proteínas sirviendo de «interfase» para la interacción con proteínas SUMOiladas (Kerscher, 2007).

El análisis de la secuencia de PHD1 mostró la presencia de un posible motivo SIM (ver Figura V.1.2.1). Para facilitar el estudio de la funcionalidad de dicho SIM se mutaron las dos leucinas que integran este motivo por alaninas, generándose el mutante PHD1-SIMmut. A pesar de las diferencias en los niveles de expresión de ambas proteínas, las dos bandas correspondientes a los conjugados de PHD1-SUMO siguen estando presentes al mutar el SIM potencial de PHD1, sugiriendo que este motivo no es necesario para su SUMOilación (Figura V.1.3).

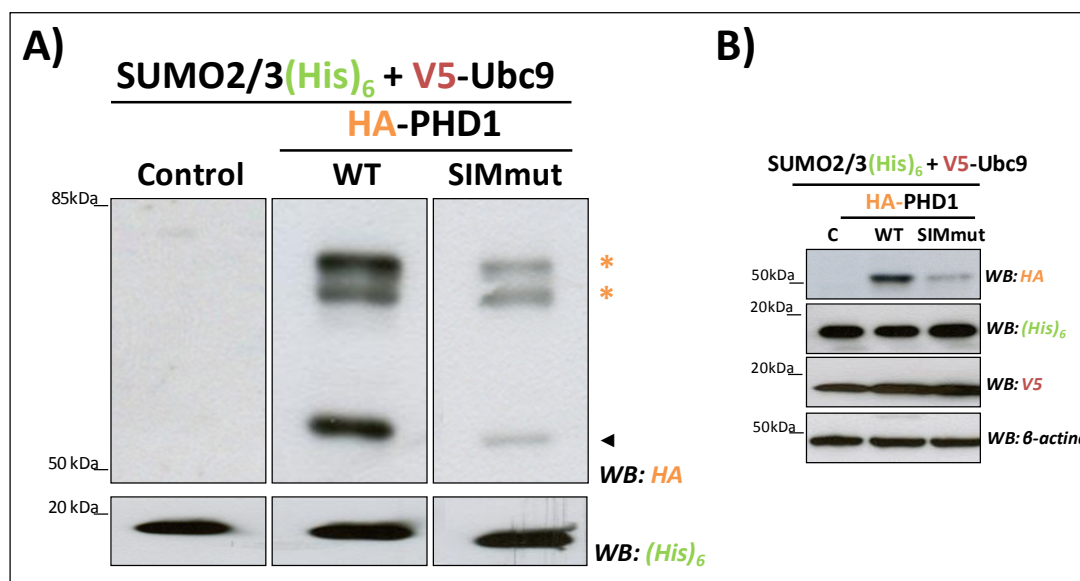


Figura V.1.3. El motivo SIM potencial no contribuye a la SUMOilación de PHD1. **A)** Células HEK293T se co-transfectaron, en placas de 100mm, con 12µg de SUMO3(His)₆, 3µg de V5-Ubc9 y 3µg de HA-PHD1-WT, HA-PHD1-SIMmut o pcDNA3. Los extractos se purificaron a las 48 horas con una resina de níquel en condiciones desnaturizantes y la proteína purificada se visualizó por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-HA y anti-(His)₆. **B)** En paralelo, se analizó la expresión de las proteínas en los extractos totales. (◄) y (*) se corresponden con formas no-modificadas y modificadas de la proteína, respectivamente.

V.1.4 Regulación de la SUMOilación de PHD1 por hipoxia

La hipoxia regula la actividad enzimática de las PHDs e incrementa la expresión de SUMO1 y la formación de conjugados de SUMO (Comerford et al., 2003; Hirsilä et al., 2003; Shao et al., 2004). Partiendo de estas premisas, se evaluó si la hipoxia regula la SUMOilación de PHD1. Para ello, las células se incubaron en condiciones de normoxia, hipoxia aguda (16 horas) o hipoxia crónica (7 días) y se analizó la formación de conjugados PHD1-SUMO. De la Figura V.1.4.1 se concluye que la SUMOilación de PHD1 disminuye tras la exposición a hipoxia.

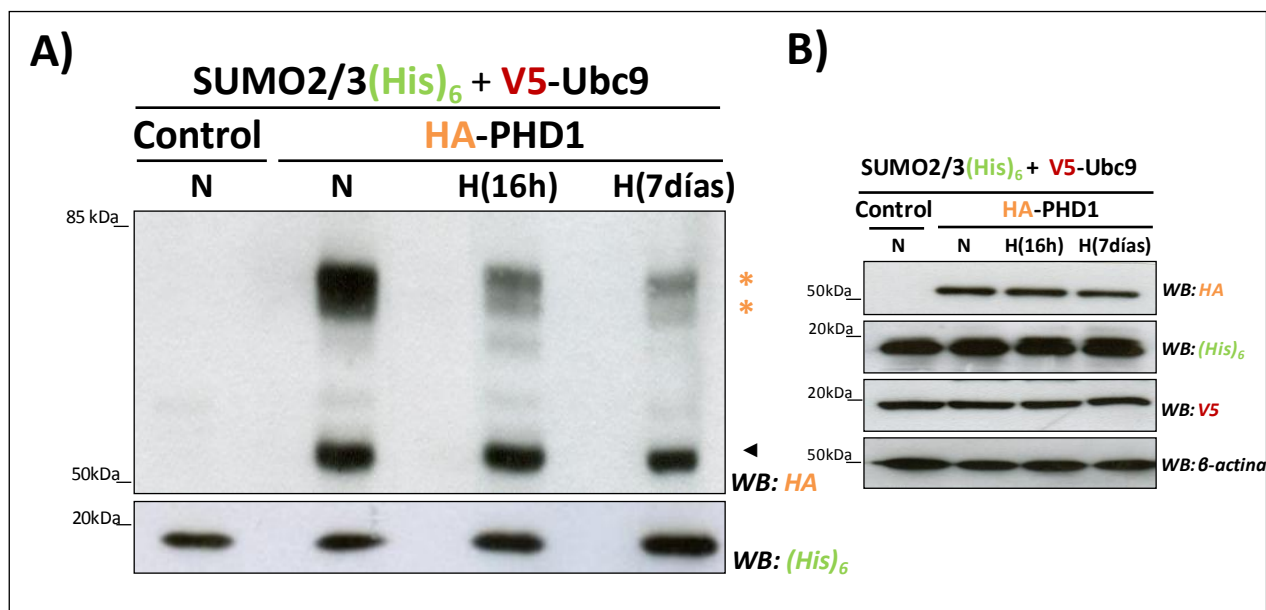


Figura V.1.4.1. La disponibilidad de oxígeno regula la SUMOilación de PHD1. **A)** Células HEK293T se incubaron en normoxia (N; 20% de O₂) o hipoxia (H; 1% de O₂) durante 16 horas o 7 días y se co-transfectaron, en placas de 100mm, con 3µg de HA-PHD1-WT o pcDNA3, 3µg de V5-Ubc9 y 12µg de SUMO3(His)₆ 48 horas antes de la lisis. Los extractos se purificaron con una resina de níquel en condiciones desnaturalizantes y la proteína purificada se visualizó por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-HA y anti-(His)₆. **B)** En paralelo, se analizó la expresión de las proteínas en los extractos totales. (◄) y (*) se corresponden con formas no-modificadas y modificadas de PHD1, respectivamente.

También se analizó la contribución de las dos regiones SUMOilables de PHD1 al efecto inhibitor de la hipoxia sobre su SUMOilación. Utilizando las formas truncadas anteriormente descritas, comprobamos que la SUMOilación de la construcción N-ter disminuye de forma apreciable en condiciones de hipoxia mientras que la SUMOilación de la forma C-ter apenas varía (Figura V.1.4.2).

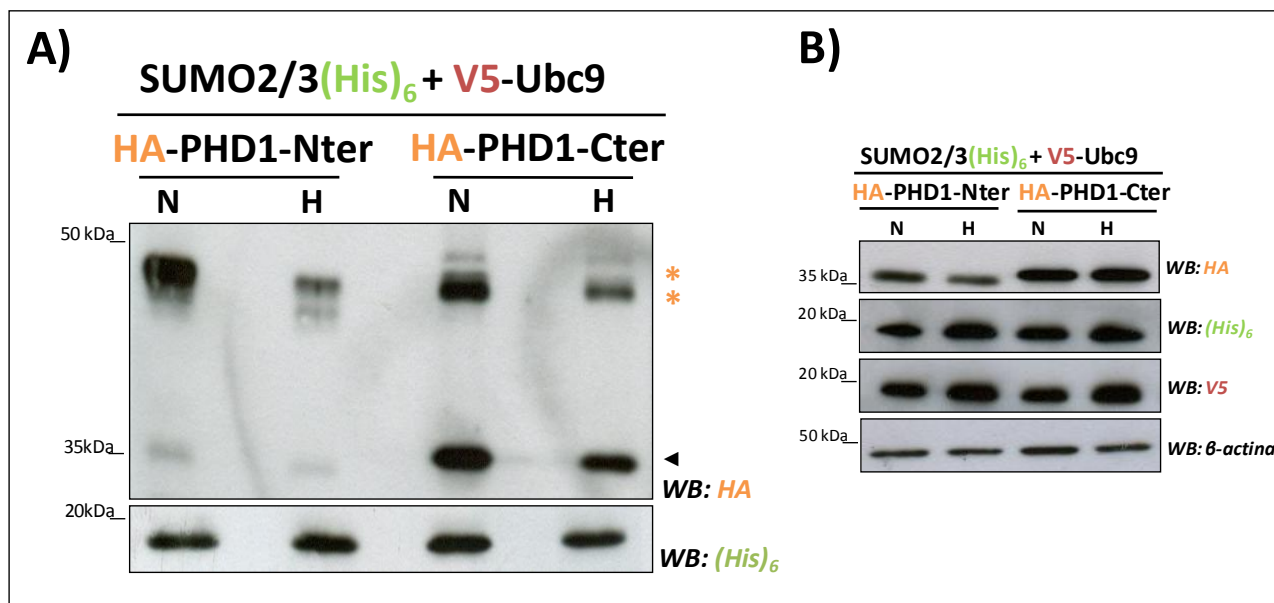


Figura V.1.4.2. La SUMOilación de HA-PHD1-Nter disminuye en hipoxia. **A)** Células HEK293T se co-transfectaron, en placas de 100mm, con 3µg de HA-PHD1-Nter o HA-PHD1-Cter junto con 3µg de V5-Ubc9 y 12µg de SUMO3(His)₆ y se incubaron en normoxia (N: 20% de O₂) o hipoxia (H: 1% de O₂) durante 16 horas. Los extractos se purificaron con una resina de níquel en condiciones desnaturalizantes y la proteína purificada se visualizó por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-HA y anti-(His)₆. **B)** Análisis de la expresión proteica en los extractos totales. (◄) y (*) se corresponden con formas no-modificadas y modificadas de las proteínas, respectivamente.

Para evaluar si la SUMOilación depende de la actividad de las PHDs utilizamos el inhibidor DMOG que actúa como un inhibidor competitivo del 2-oxoglutarato. Tal y como se observa en la Figura V.1.4.3, la SUMOilación de PHD1 no se ve afectada por la inhibición de la actividad hidroxilasa.

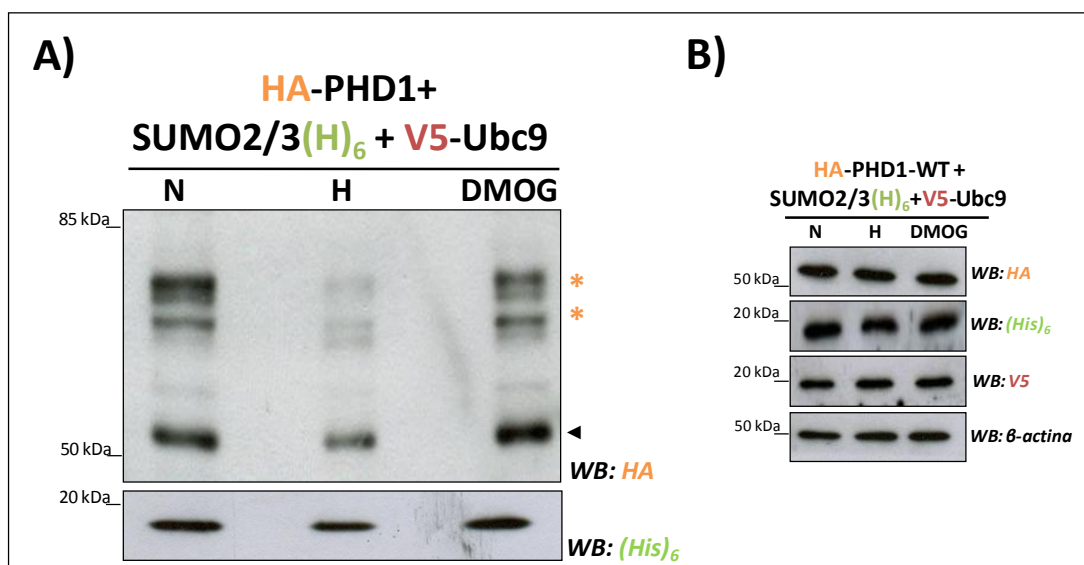


Figura V.1.4.3. La SUMOilación de PHD1 es independiente de la actividad hidroxilasa. **A)** Células HEK293T se co-transfectaron, en placas de 100mm, con 3µg de HA-PHD1-WT o pcDNA3, 3µg de V5-Ubc9 y 12µg de SUMO3(His)₆ y se trataron con DMOG (1mM) o incubaron en hipoxia (H: 1% de O₂) durante 16 horas. Los extractos se purificaron con una resina de níquel en condiciones desnaturalizantes y la proteína purificada se visualizó por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-HA y anti-(His)₆. **B)** En paralelo, se analizó la expresión proteica en los extractos totales. (◄) y (*) se corresponden con formas no-modificadas y modificadas de PHD1, respectivamente.

V.1.5 Impacto de la SUMOilación en la estabilidad de PHD1

La modificación por SUMO puede tener repercusión sobre múltiples y variados aspectos de la proteína diana tales como la estabilidad, el transporte núcleo-citoplasmático o su actividad y por consiguiente, afectar a su funcionalidad.

Con el fin de evaluar si la SUMOilación de PHD1 tiene algún efecto sobre su estabilidad, se analizó la vida media de HA-PHD1-WT y HA-PHD1-ΔSUMO. Para ello, se transfectaron estos constructos en células HEK293T y, a las 24 horas de la transfección, las células se trataron con el inhibidor de la síntesis proteica, cicloheximida (CHX), a diferentes tiempos (2, 4 y 8 horas). Posteriormente, las células se lisaron y se evaluaron los niveles de expresión en los extractos celulares por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-HA. Los resultados de la Figura V.1.5 muestran claramente que la vida media de ambos constructos es semejante y sugieren que la SUMOilación de PHD1 no afecta a su estabilidad.

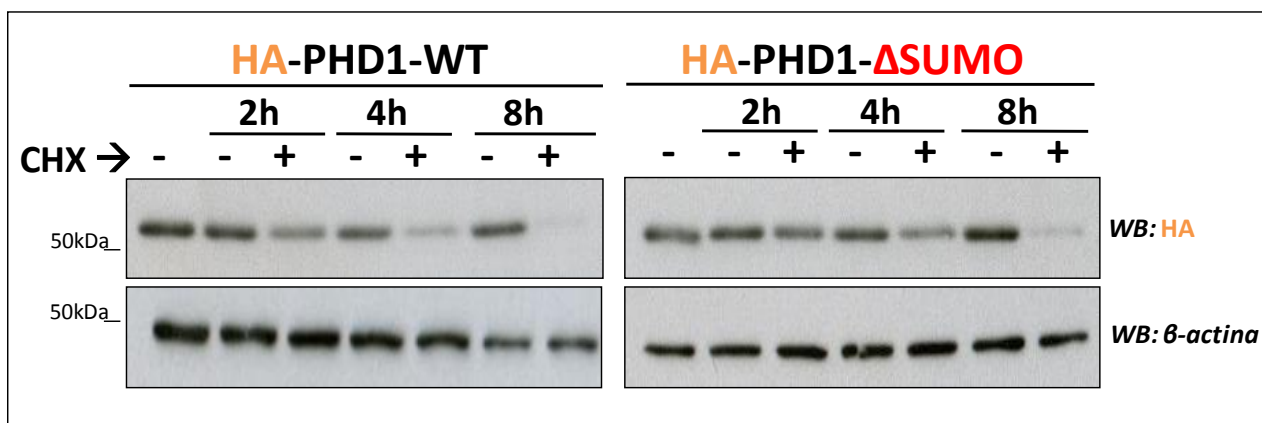


Figura V.1.5. PHD1- Δ SUMO tienen una vida media similar a la de PHD1-WT. Se transfectaron células HEK293T, en placas de 35mm, con 1 μ g de HA-PHD1-WT o HA-PHD1- Δ SUMO. Tras 24 horas de expresión, las células se trataron con CHX (20 μ g/ml) durante los tiempos indicados y se lisaron con Laemmli. La expresión proteica se analizó por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-HA.

V.1.6 Impacto de la SUMOilación en la localización celular de PHD1

Varios autores han identificado la presencia de una NLS bipartita en el extremo N-terminal de PHD1 (Steinhoff et al., 2009; Yasumoto et al., 2009). Las Ks 118 y 120 (dos de los tres residuos diana de SUMOilación de PHD1) se sitúan en un *cluster* esencial de dicha NLS que media la interacción de PHD1 con varias importinas necesarias para la localización nuclear de PHD1 (Steinhoff et al., 2009).

Para evaluar si la SUMOilación regula la localización nuclear de PHD1, se analizó por inmunofluorescencia la expresión de los diferentes constructos descritos con anterioridad. Como se muestra en la Figura V.1.6.1 y de acuerdo con estudios previos, PHD1-WT se localiza casi exclusivamente en el núcleo (Metzen et al., 2003). PHD1-Nter presenta del mismo modo una localización mayoritariamente nuclear; sin embargo, la mutación de las Ks 118 y 120 (que preserva la carga positiva de la NLS) conlleva una fuerte acumulación de la proteína en el citoplasma. Por su parte, PHD1-Cter, que carece de NLS, se ubica tanto en el núcleo como en citoplasma, tal y como era de esperar.

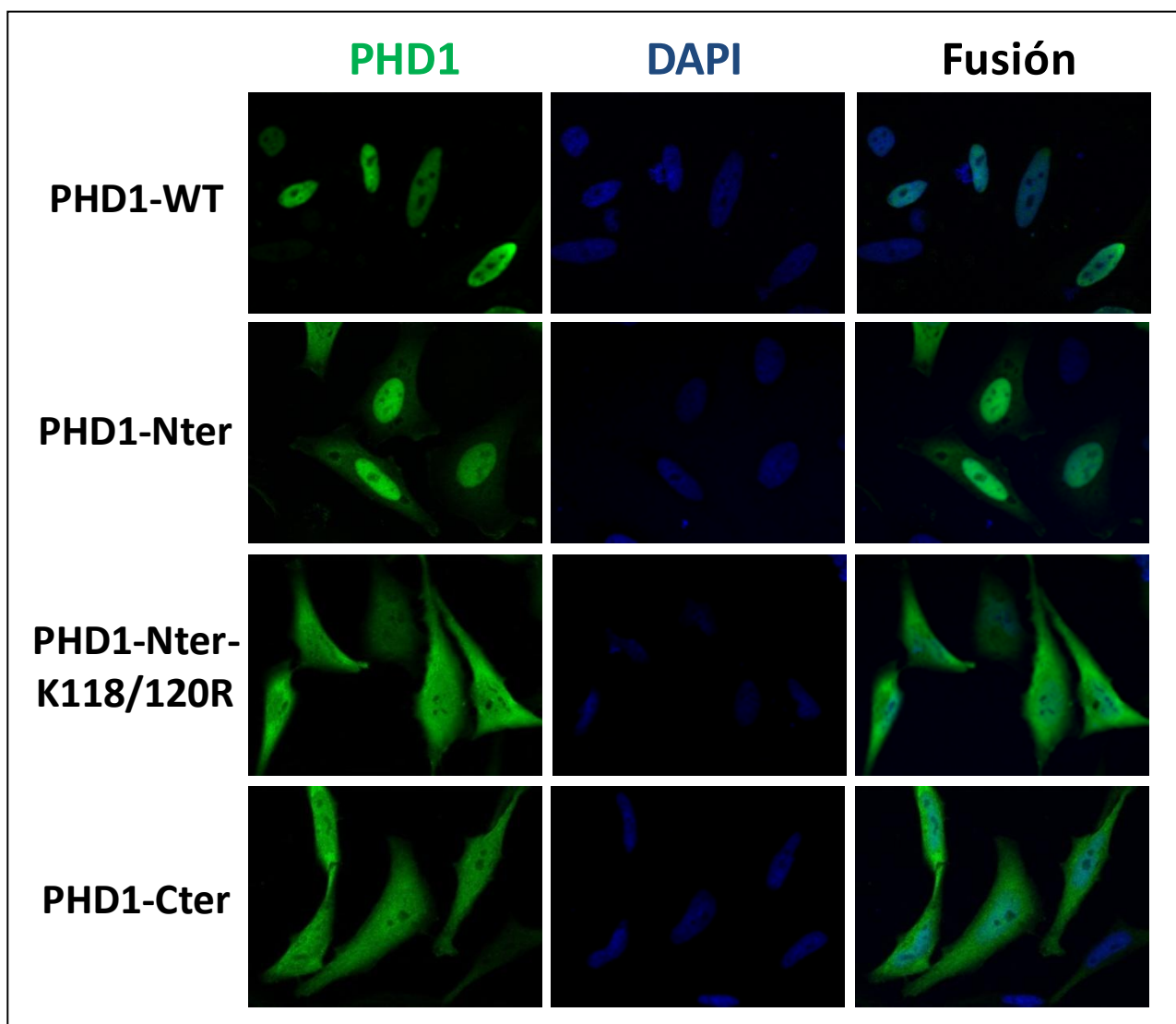


Figura V.1.6.1. Localización celular de las formas truncadas de PHD1. Células HeLa se transfectaron con 1 μ g de HA-PHD1-WT, HA-PHD1-Nter, HA-PHD1-Nter-K118/120R o HA-PHD1-C-ter, en placas de 35mm. A las 24 horas, las células se fijaron en paraformaldehído (3%) y se analizó la expresión de proteínas por inmunofluorescencia con anti-HA como anticuerpo primario y anti-Alexa488 como secundario. Los núcleos se visualizaron con DAPI.

Asimismo, los diferentes mutantes de SUMOilación de PHD1 en el contexto de la proteína completa, confirman los resultados anteriores. HA-PHD1-K118/120R y HA-PHD1- Δ SUMO presentan una mayor localización citoplasmática en comparación con PHD1-WT (Figura V.1.6.2). Además, PHD1-K361R se ubica exclusivamente en el núcleo.

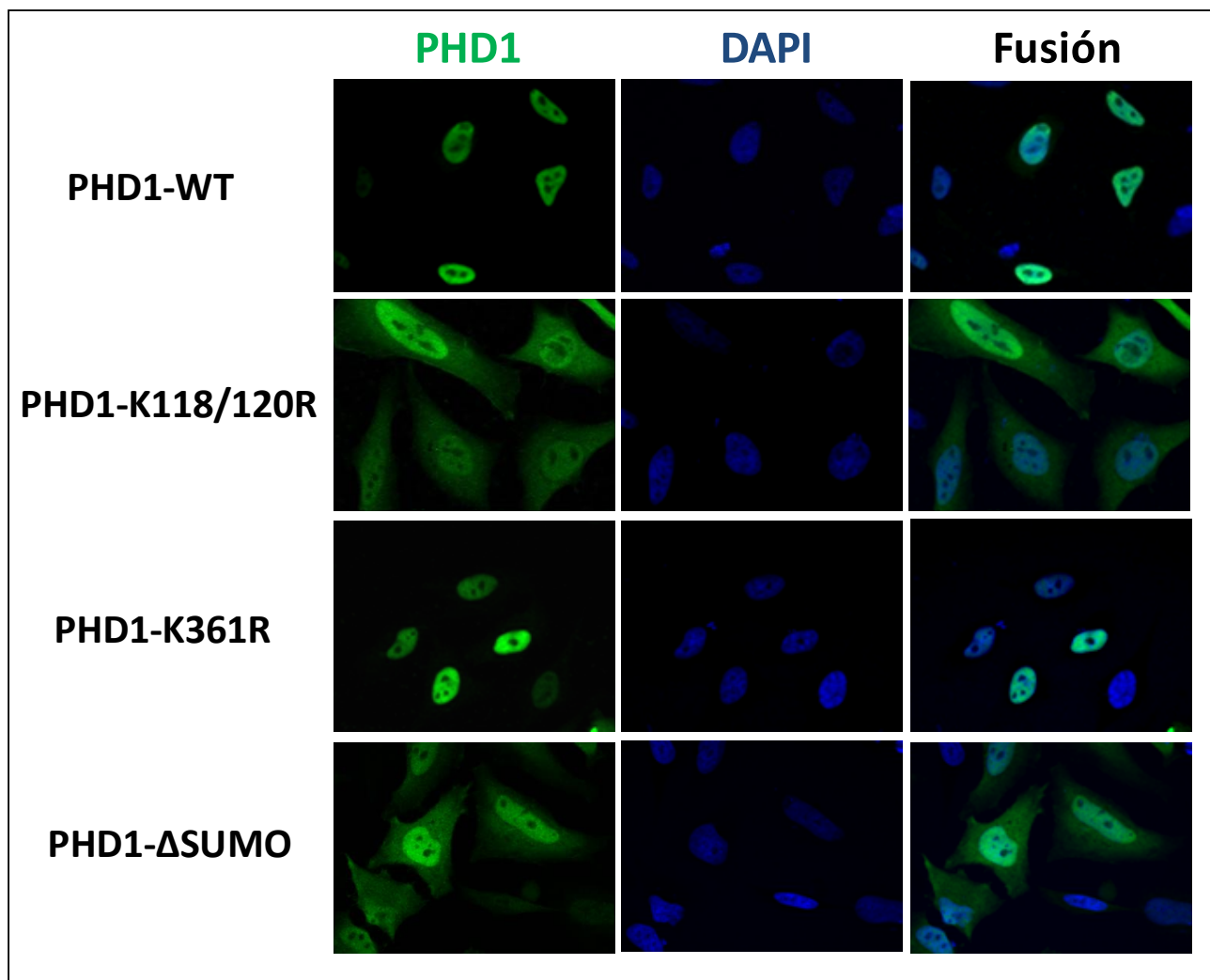


Figura V.1.6.2. Localización celular de los diferentes mutantes de PHD1. Células HeLa se transfectaron con 1 μ g de HA-PHD1-WT, HA-PHD1-K118/120R, HA-PHD1-K361R o HA-PHD1- Δ SUMO, en placas de 35mm. A las 24 horas, las células se fijaron en paraformaldehído (3%) y se analizó al expresión de las proteínas por inmunofluorescencia con anti-HA como anticuerpo primario y anti-Alexa488 como secundario. Los núcleos se visualizaron con DAPI.

Para confirmar la implicación de los conjugados PHD1-SUMO en la localización de PHD1 y excluir la posibilidad de un efecto inespecífico debido a la substitución de Ks por Rs, evaluamos las consecuencias de la expresión de una deSUMOilasa en la localización de PHD1. En concreto, expresamos una forma truncada de SENP1 que carece de especificidad de sustrato aunque conserva intacta su actividad catalítica (Kim et al., 2005). Así, comprobamos que la expresión de SENP1 disminuye la proporción de conjugados PHD1-SUMO en un nuevo ensayo de SUMOilación *in cellulo* (Figura V.1.6.3).

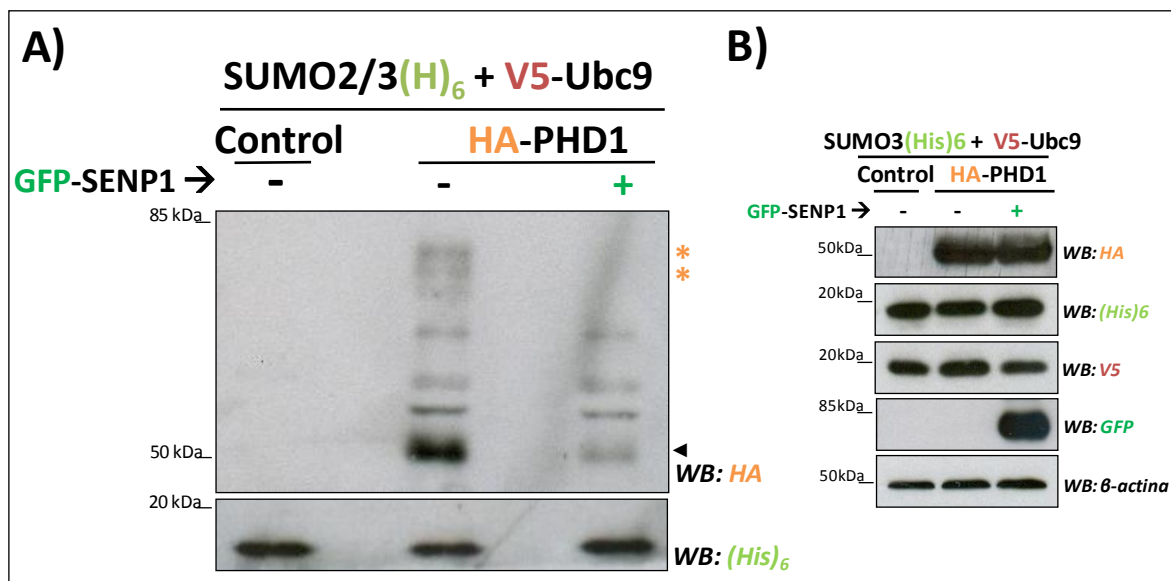


Figura V.1.6.3. GFP-SENP1 deSUMOíla HA-PHD1-WT. **A)** Células HEK293T se co-transfectaron, en placas de 100mm, con 3µg de HA-PHD1-WT o un plásmido vacío, 12µg de SUMO3(His)₆ y 3µg de V5-Ubc9 con o sin 3µg de GFP-SENP1. Los extractos se purificaron con una resina de níquel en condiciones desnaturalizantes y la proteína purificada se visualizó por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-HA y anti-(His)₆. **B)** En paralelo se analizó la expresión de las proteínas en los extractos totales. (◀) y (*) se corresponden con formas no-modificadas y modificadas de PHD1, respectivamente.

Los resultados de la IF muestran que aquellas células que sobre-expresan SENP1 presentan un incremento en la localización citoplasmática de HA-PHD1-WT (Figura V.1.6.4). Por otro lado, la localización celular de HA-PHD1-K118/120R no se ve afectada, demostrando que la acción de SENP1 sobre PHD1-WT es directa y no consecuencia de la actividad deSUMOílasa de SENP1 sobre otras proteínas potencialmente implicadas en el transporte núcleo-citoplasmático.

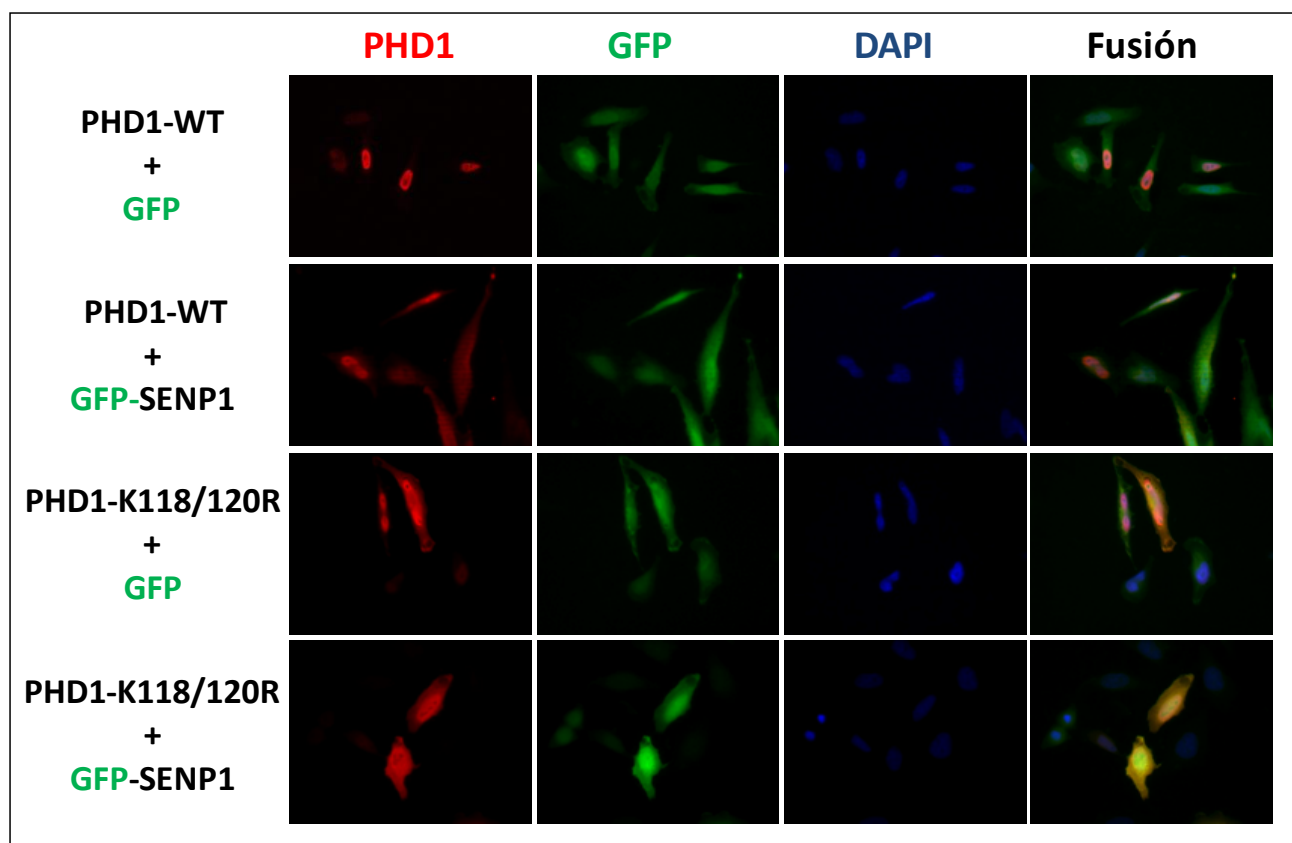


Figura V.1.6.4. SENP1 aumenta la localización citoplasmática de HA-PHD1-WT. Células HeLa se co-transfectaron, en placas de 35mm, con 1 μ g de HA-PHD1-WT o HA-PHD1-K118/120R y 0.5 μ g GFP o GFP-SENP1. A las 48 horas, las células se fijaron en paraformaldehído (3%) y se analizó la expresión de los constructos de PHD1 por inmunofluorescencia con anti-HA como anticuerpo primario y anti-Alexa598 como secundario. Los núcleos se visualizaron con DAPI.

Por otra parte y dado que la formación de conjugado SUMO-PHD1 disminuye en condiciones de hipoxia (ver Figura V.1.4.1), se planteó estudiar si la hipoxia afecta la localización celular de PHD1. En efecto, tal y como cabía esperar, la localización citoplasmática de PHD1-WT se ve incrementada en condiciones de hipoxia si bien la proteína mantiene una localización mayoritariamente nuclear (Figura V.1.6.5).

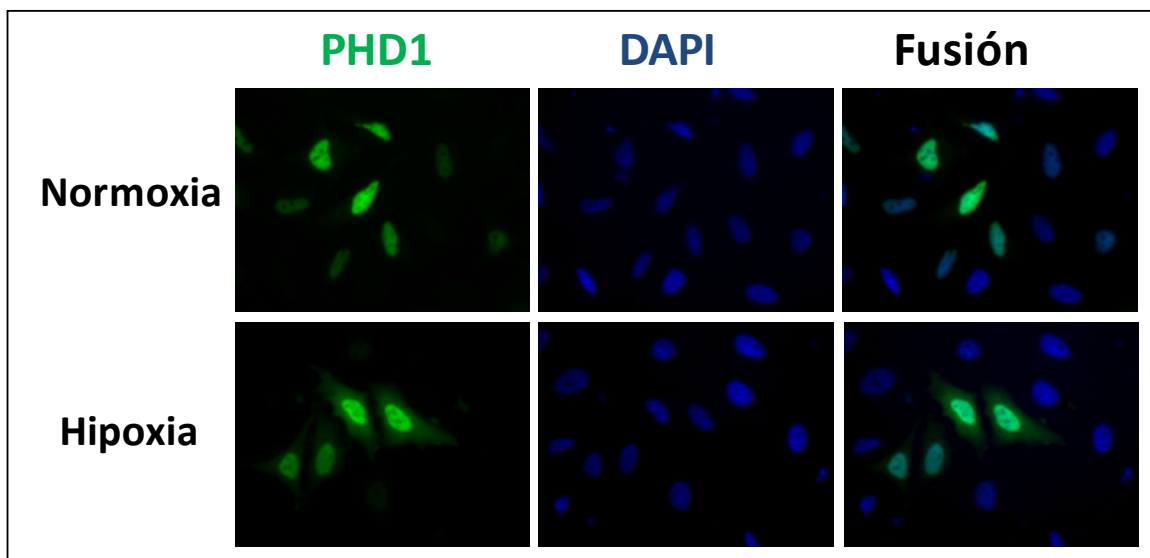


Figura V.1.6.5. Hipoxia regula la localización celular de PHD1. Células HeLa se transfectaron con 1 μ g de HA-PHD1-WT, en placas de 35mm. 24 horas después de la transfección, las células se incubaron en normoxia o hipoxia (1% de O₂) durante 16 horas. Se fijaron en paraformaldehído (3%) y se analizó al expresión de PHD1 por inmunofluorescencia con anti-HA como anticuerpo primario y anti-Alexa488 como secundario. Los núcleos se visualizaron con DAPI.

Estos resultados sugieren que al igual que sucede para otras proteínas como Smad4 o Erb4, la SUMOilación favorece su localización nuclear (Lin et al., 2003a; Sundvall et al., 2012). Sin embargo, en este punto no podemos concluir si la SUMOilación promueve el importe hacia el núcleo de PHD1 o si previene el exporte de dicha proteína hacia el citoplasma. Con el fin de analizar si la SUMOilación de PHD1 afecta a su importe nuclear se empleó la técnica de microscopía *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) (Axelrod et al., 1976). En esta técnica, las proteínas fluorescentes localizadas en un área de interés son fotoblanqueadas empleando un láser de alta intensidad. El tiempo necesario para la recuperación de la fluorescencia en esta área, es una medida cuantitativa de la movilidad de las proteínas.

Así, se utilizó esta técnica para analizar la difusión desde el citoplasma hacia el núcleo de PHD1-WT y del mutante PHD1-K118/120R conjugados a un *tag* mRUBY2, siendo el núcleo el área fotoblanqueada. El tiempo necesario para recuperar la fluorescencia nuclear es similar para ambos constructos si bien la intensidad de la señal es algo más intensa en el caso de PHD1-K118/120R debido a su mayor localización citoplasmática basal (Figura V.1.6.6). Estos resultados sugieren, por consiguiente, que el importe nuclear de PHD1 no se ve afectado por la conjugación de SUMO.

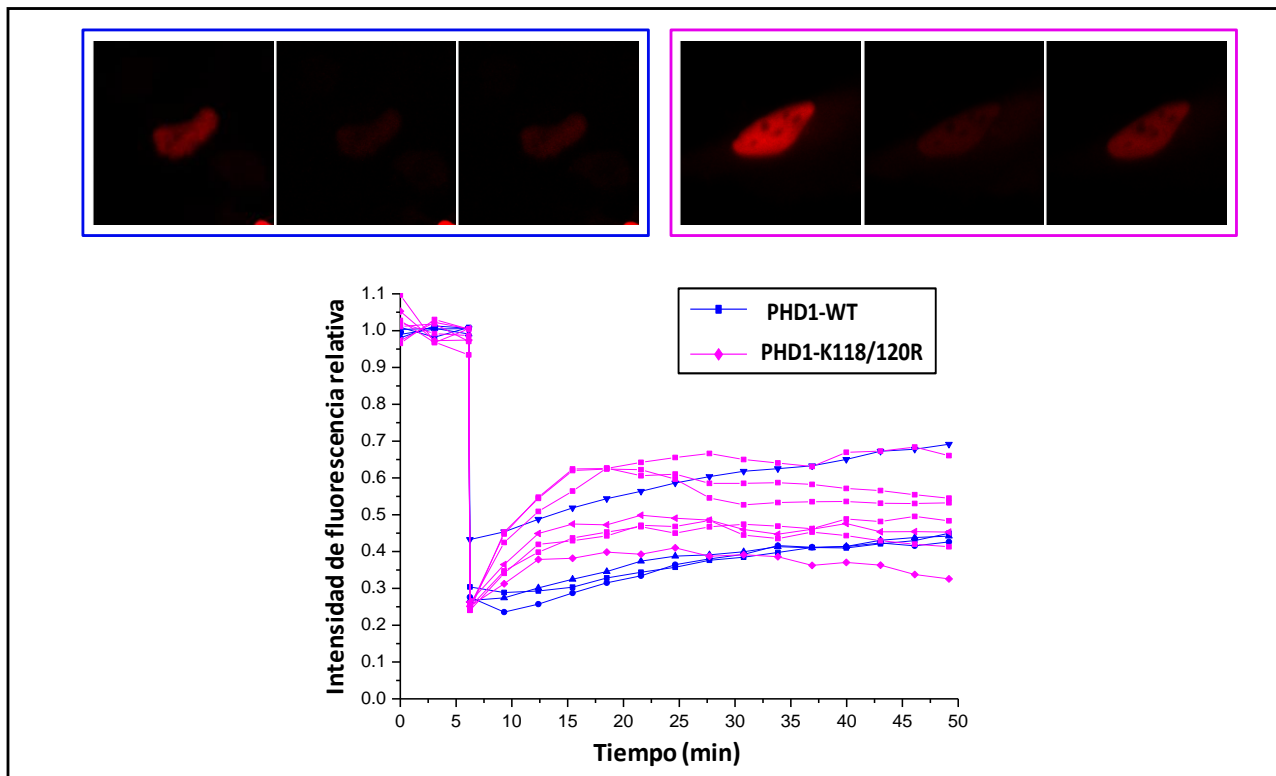


Figura V.1.6.6. La SUMOilación de PHD1 no afecta a su importe nuclear. Análisis por FRAP de la difusión de PHD1-WT y PHD1-K118/120R. En la gráfica se muestran las curvas de recuperación de fluorescencia nuclear en función del tiempo. En los paneles superiores se muestran fotografías tomadas en tiempo real de la localización nuclear de una célula HeLa representativa de la transfección con PHD1-WT y PHD1-K118/120R. Las fotografías corresponden a cada uno de los constructos antes (primera imagen), durante (segunda imagen) y después (tercera imagen) del fotoblanqueo.

Para confirmar el papel de la SUMOilación en el exporte nuclear de PHD1, recurrimos al empleo de leptomicina B (LMB) (Wolff et al., 1997). Analizando la Figura V.1.6.7 se advierte la acumulación de PHD1-K118/120R en el núcleo tras el tratamiento mientras que la localización de PHD1-WT no se ve afectada. Como control positivo se empleó GFP-MEK, que se acumula en el núcleo tras el tratamiento con LMB.

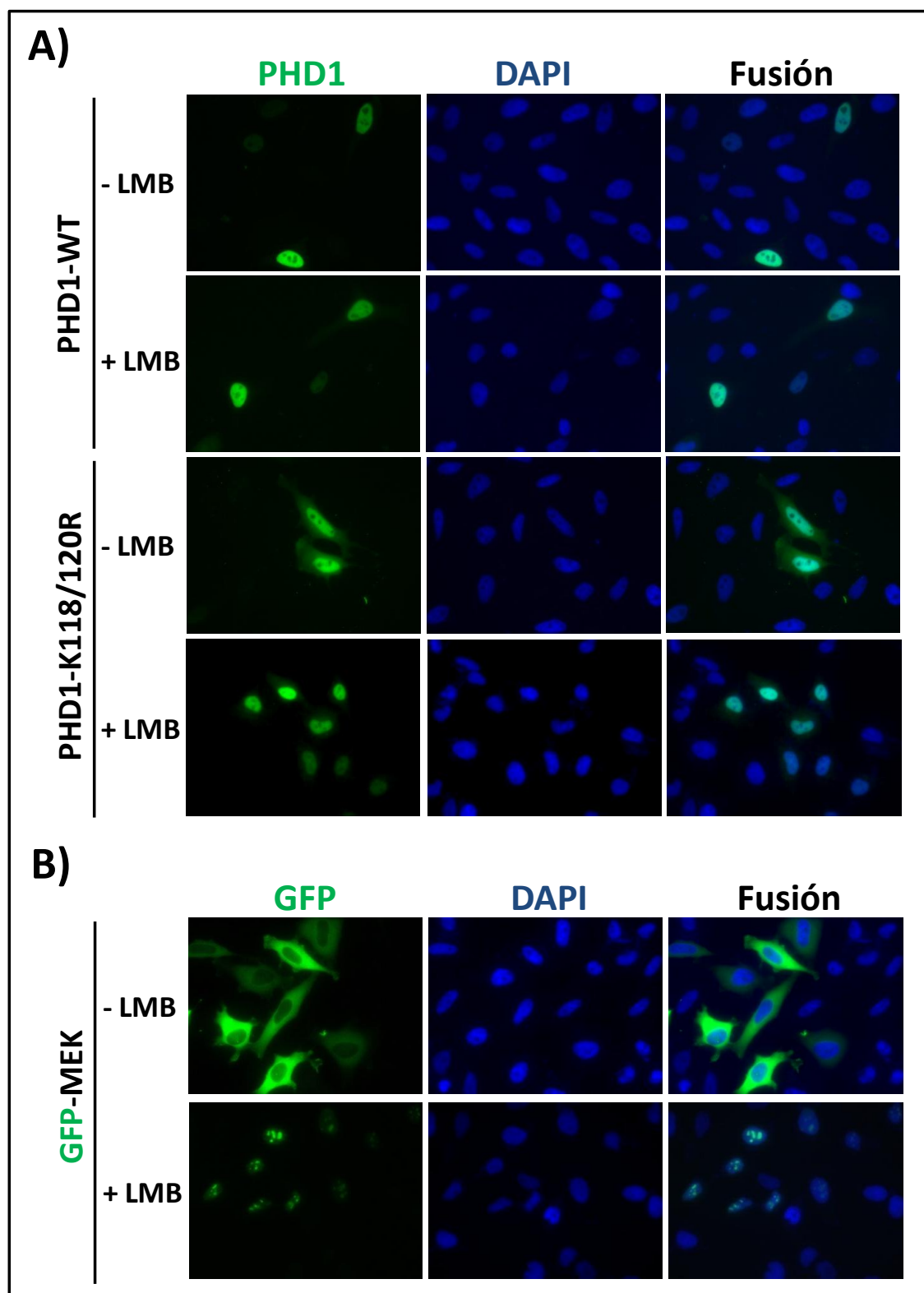


Figura V.1.6.7. La leptomicina B aumenta la acumulación nuclear de HA-PHD1-K118/120R. **A)** Células HeLa se transfectaron, en placas de 35mm, con $1\mu\text{g}$ de HA-PHD1-WT o HA-PHD1-K118/120R. A las 24 horas de la transfección, las células se trataron con LMB (10nM) durante 4 horas y se fijaron con paraformaldehído (3%). Posteriormente, se realizó una inmunofluorescencia con anti-HA como anticuerpo primario y anti-Alexa488 como secundario. Los núcleos se visualizaron por DAPI. **B)** Células HeLa se transfectaron con el plásmido GFP-MEK y se trataron tal y como se ha descrito en A).

Estos resultados en su conjunto sugieren que la SUMOilación de PHD1 sobre las Ks 118 y 120 sitas en la NLS de la proteína es responsable de la acumulación nuclear de PHD1 al inhibir su exporte nuclear si bien no afecta al importe de la proteína.

V.1.7 Relevancia funcional de la SUMOilación de PHD1

En este apartado, se muestran las aproximaciones realizadas para evaluar la funcionalidad de los conjugados PHD1-SUMO analizando diversas dianas de PHD1.

V.1.7.1 PHD1-SUMO e HIF

Por razones obvias, se analizó, en primer lugar, el efecto de la SUMOilación de PHD1 en la actividad transcripcional de HIF. Para ello, se expresaron los diferentes mutantes de PHD1 junto con el plásmido reportero luciferasa bajo el control de tres elementos de respuesta a hipoxia (3xHRE-Luc) y el plásmido CMV-βgal como normalizador de la transfección y se incubaron las células en normoxia o hipoxia. Como se observa en la Figura V.1.7.1, PHD1-WT, pero no el mutante que carece de actividad hidroxilasa (PHD1-H358A), inhibe la actividad transcripcional de HIF inducida por hipoxia. Además, los tres mutantes de SUMOilación de PHD1 inhiben esta actividad de manera similar a la forma WT, sugiriendo que la SUMOilación de PHD1 no afecta a la activación de HIF en respuesta a hipoxia. Como era de esperar, el análisis por RT-qPCR confirmó que PHD1-WT y PHD1-ΔSUMO inhiben la expresión de CA9, una diana endógena de HIF-1, de igual forma (Figura V.1.7.1).

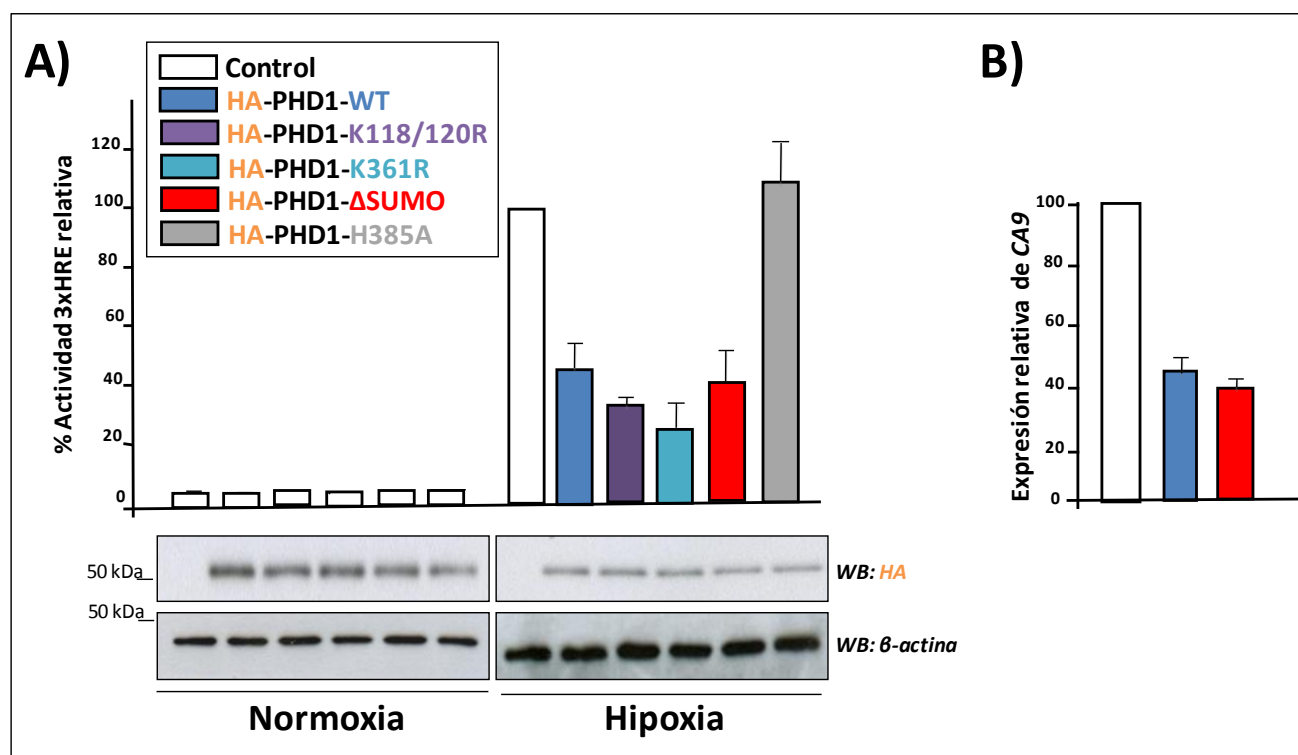


Figura V.1.7.1. La SUMOilación de PHD1 no afecta la activación de HIF. A) Se transfectaron células HEK293T, en placas p48, con pcDNA3 (50ng), HA-PHD1-WT (20ng+30ng de pcDNA3), HA-PHD1-K118/120R (20ng+30ng de pcDNA3), HA-PHD1-K361R (30ng+20ng de pcDNA3), HA-PHD1-ΔSUMO (30ng+20ng de pcDNA3) o HA-PHD1-H358A (50ng) junto con 3xHRE-Luc (32ng) y CMVβ-Gal (32ng). Las células se mantuvieron en normoxia o se incubaron en hipoxia (1% O₂, 16h) y se midió la actividad luciferasa y β-galactosidasa. Los valores representan el % de la actividad HRE/βgal con respecto a células control en hipoxia (100%). En paralelo, se prepararon extractos celulares y se evaluó los niveles de expresión de los diferentes constructos por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-HA. **B)** Se extrajo el ARNm de células tratadas como en A) y se analizó la expresión endógena de CA9 por RT-qPCR. Los valores representan los niveles relativos de expresión de CA9 con respecto a células control en hipoxia (100%). Los resultados corresponden al menos a tres experimentos independientes realizados en triplicados y el WB es una muestra representativa de uno de los experimentos.

V.1.7.2 PHD1-SUMO y NFκB

Cummins y colaboradores demostraron que PHD1 regula negativamente la actividad NFκB al inhibir IKKβ (Cummins et al., 2006). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, la hipoxia no es capaz de aumentar la actividad NFκB y la expresión de PHD1 tampoco inhibió la respuesta inducida por TNFα y ello en dos modelos celulares diferentes (HeLa y HEK293T) (resultados no mostrados y Figura V.1.7.2).

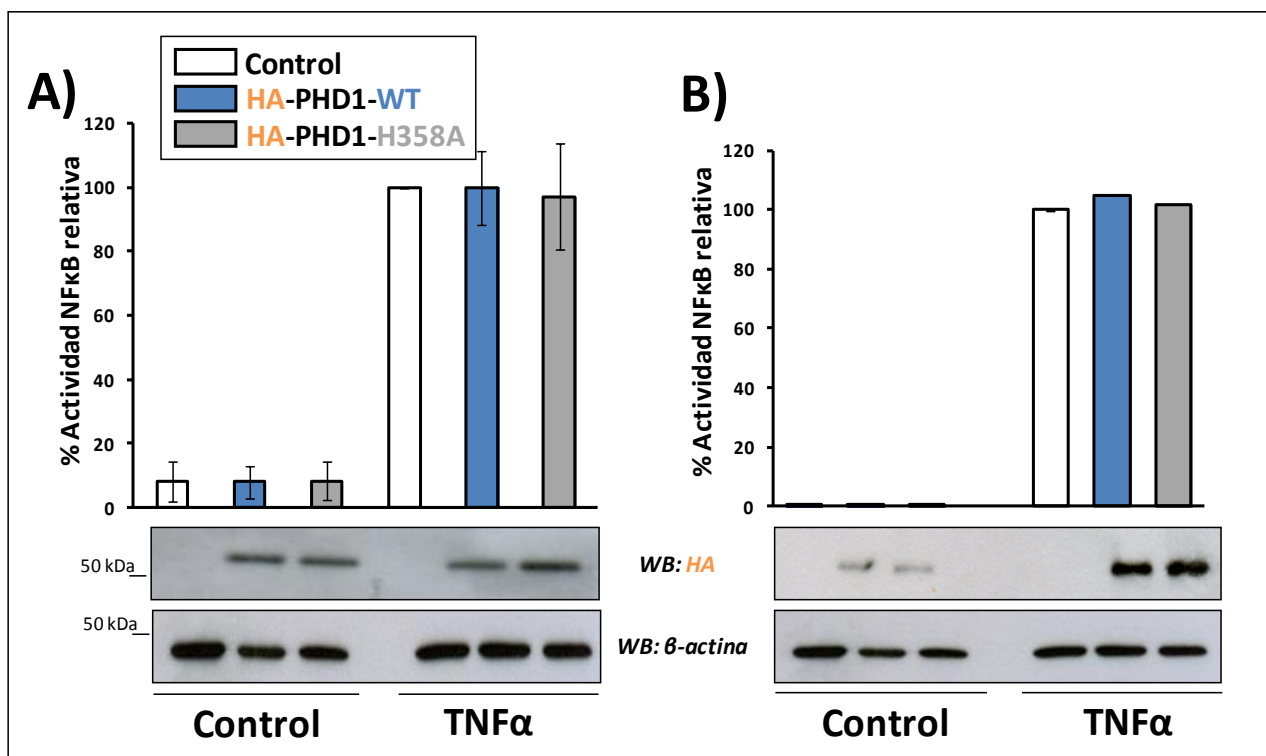


Figura V.1.7.2. Efecto de PHD1 sobre NFκB. Se transfectaron células HeLa (A) o HEK293T (B) con pcDNA3 (50ng), HA-PHD1-WT (20ng+30ng de pcDNA3) o HA-PHD1-H358A (50ng) junto con NFκB-LUC (32ng) y SV40-βGal (32ng), en placas p48. Las células se trataron con TNFα (20ng/ml) durante 16h y se midió la actividad luciferasa y β-galactosidasa. En paralelo, se prepararon extractos celulares y se evaluó los niveles de expresión de los diferentes constructos por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-HA. Los valores representan el % de la actividad NFκB/βgal con respecto a células control tratadas con TNFα (100%). Estos resultados corresponden al menos a tres experimentos independientes realizados en triplicado y el WB es una muestra representativa de uno de los experimentos.

V.1.7.3 PHD1-SUMO y ciclina-D1, ERα y PR

Como se ha mencionado anteriormente, la pérdida de PHD1 inhibe la proliferación de tumores mamarios en respuesta a estrógeno a través de la regulación de ciclina-D1 (Zhang et al., 2009). Esta regulación tiene lugar a nivel transcripcional y post-transcripcional y depende de la actividad hidroxilasa de PHD1. En este contexto, evaluamos el posible impacto de PHD1-SUMO sobre la expresión de ciclina-D1. Además, y en base a los resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, extendimos el estudio a la regulación de ERα y su diana PR en líneas celulares derivadas de cáncer de mama ERα(+).

Acorde con las publicaciones previas, la hipoxia disminuye los niveles de expresión de ciclina-D1 y ERα/PR (Figura V.1.7.3.1). Además, la expresión de PHD1-WT incrementa dichos niveles en normoxia pero no en hipoxia (Figura V.1.7.3.1). Sin embargo, la expresión del mutante PHD1-ΔSUMO, a diferencia de PHD1-WT, no es capaz de inducir la expresión de ciclina-D1 y ERα/PR (Figura V.1.7.3.1). Los resultados sugieren, por

consiguiente, que la SUMOilación de PHD1 es necesaria para regular los niveles de expresión de ciclina-D1 y ER α /PR que precisa, a su vez, de la actividad hidroxilasa de PHD1.

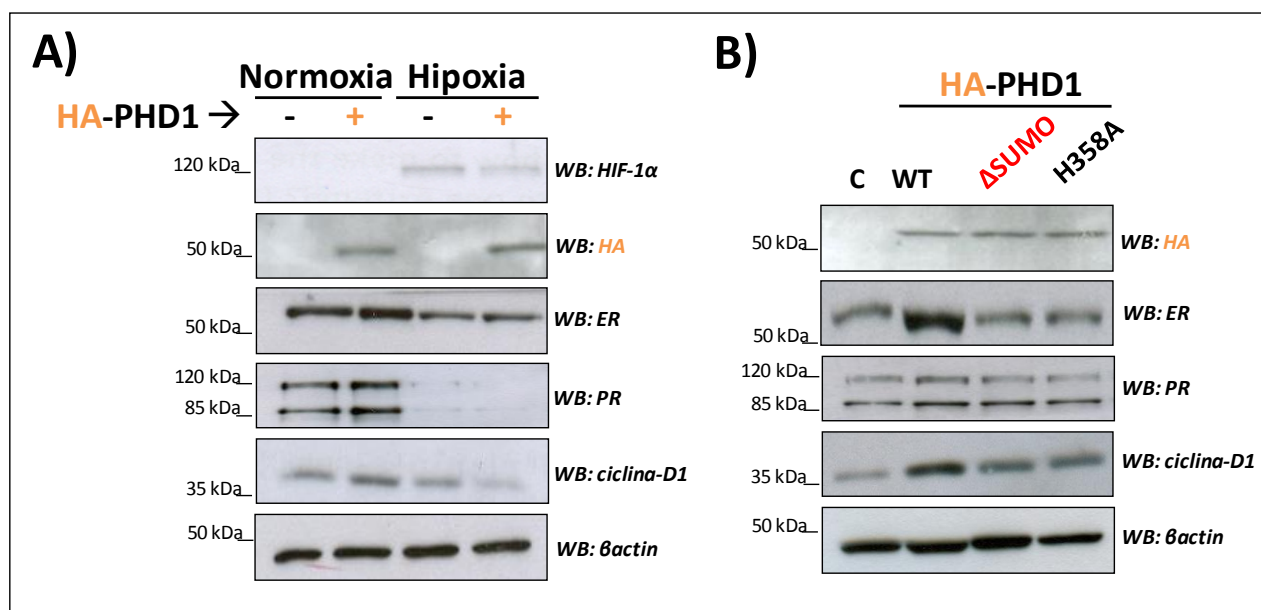


Figura V.1.7.3.1. Efecto de la SUMOilación de PHD1 sobre la regulación de ciclina-D1 y ER α /PR. **A)** Se transfectaron células T47D, en placas de 35mm, con pcDNA3 (750ng) o HA-PHD1-WT (300ng+450ng de pcDNA3). A las 24 horas, las células se incubaron en condiciones de normoxia o hipoxia (1% de O₂) durante 16h y se lisaron. Los niveles de expresión de las proteínas se visualizaron por Western Blot utilizando los anticuerpos indicados. **B)** Células T47D se transfectaron, en placas de 35mm, con pcDNA3 (750ng), HA-PHD1-WT (300ng+450ng de pcDNA3), HA-PHD1- Δ SUMO (300ng+450ng de pcDNA3) y HA-PHD1-H358A (750ng). Transcurridas 48 horas, se lisaron las células y se analizó la expresión de las proteínas por Western Blot con los anticuerpos indicados.

En base a estos resultados, se realizó un estudio preliminar para evaluar el efecto de la SUMOilación de PHD1 sobre la proliferación celular utilizando la línea celular T47D (ER(+)) como modelo celular. Acorde con su impacto en la expresión de ciclina-D1, la expresión de PHD1-WT induce un leve aumento en la proliferación celular de las células T47D aunque no PHD1- Δ SUMO ni PHD1-H358A y ello, sin afectar a la viabilidad celular (Figura V.1.7.3.2.).

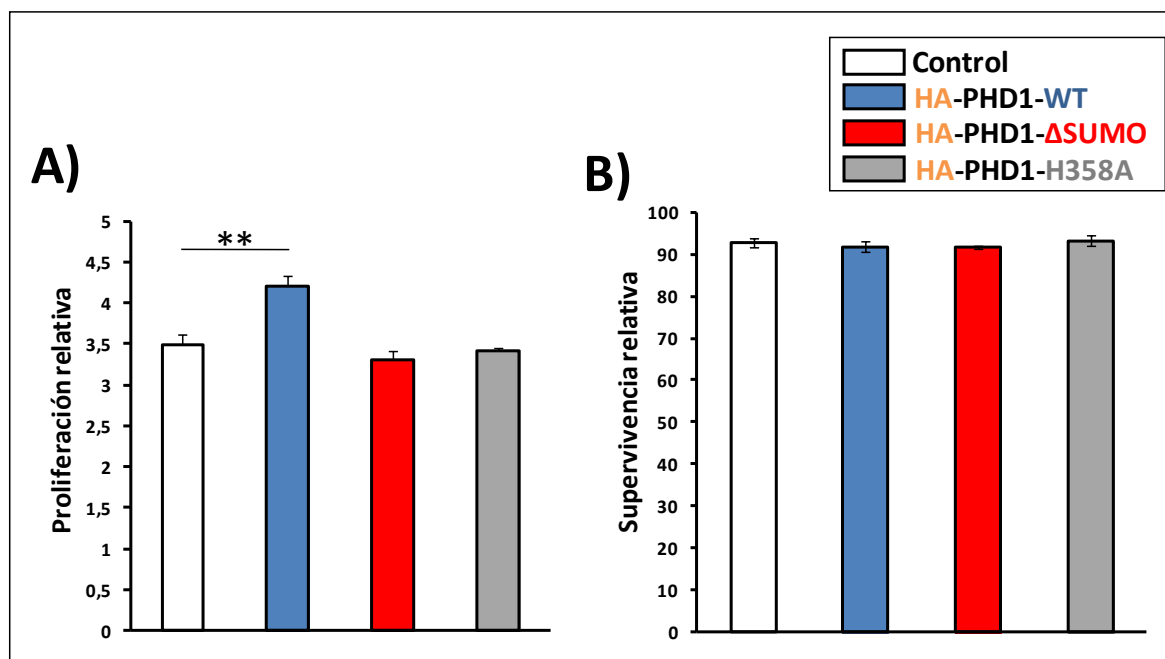


Figura V.1.7.3.2. Efecto de la SUMOilación de PHD1 en la proliferación de la línea T47D. Se transfectaron células T47D, en placas de 35mm, con 750ng de pcDNA3 o HA-PHD1-WT (300ng+450ng de pcDNA3), HA-PHD1-ΔSUMO (300ng+450ng de pcDNA3) y HA-PHD1-H358A (750ng). Se contó el número de células vivas y muertas el día 0 y a los tres días de la transfección en una cámara de *Neubauer* por el método de exclusión por *Trypan Blue*. **A)** Los valores representan el incremento en el número de células para cada una de las condiciones experimentales. **B)** Los valores representan el % de células viables. ** indica $p < 0.01$.

V.1.7.4 PHD1-SUMO y ATF4 y mTORC1

PHD1 interacciona directamente con ATF4 (Hiwatashi et al., 2011) y por ello, también analizamos las posibles consecuencias de la SUMOilación de PHD1 sobre la activación de ATF4. Como se observa en la Figura V.1.7.4.1, la expresión de PHD1-WT, PHD1-K118/120R y PHD1-K361R reprimen la activación de ATF4 inducida por hipoxia de manera similar. Sin embargo, el efecto represor es significativamente mayor como consecuencia de la expresión del mutante PHD1-ΔSUMO, lo que sugiere que la SUMOilación de PHD1 se opone al efecto represor de PHD1 sobre ATF4.

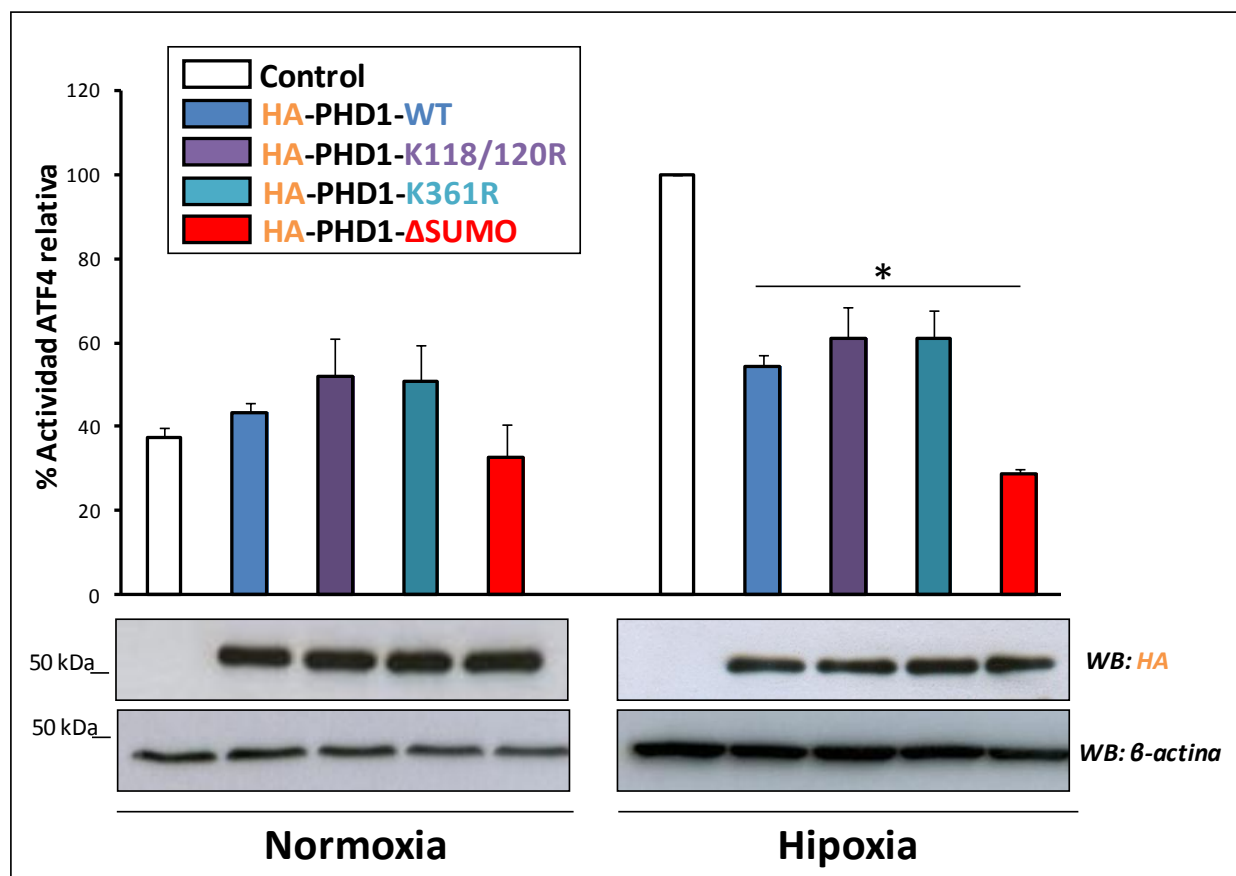


Figura V.1.7.4.1. El mutante Δ SUMO potencia el efecto represor de PHD1 sobre ATF4. Se transfectaron células HeLa en placas p48 con pcDNA3 (50ng), HA-PHD1-WT (20ng+30ng de pcDNA3), HA-PHD1-K118/120R (20ng+30ng de pcDNA3), HA-PHD1-K361R (30ng+20ng de pcDNA3) y HA-PHD1- Δ SUMO (30ng+20ng de pcDNA3) junto con pATFx2-LUC (32ng) y SV40- β Gal (32ng) para normalizar la transfección. Las células se mantuvieron en normoxia o se incubaron en hipoxia (1% O₂, 16 horas) y se midió la actividad luciferasa y β -galactosidasa. Los valores representan el % de la actividad ATF4/ β gal con respecto a células control incubadas en hipoxia (100%). En paralelo, se prepararon extractos celulares y se evaluó los niveles de expresión de los diferentes constructos por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-HA. Los resultados corresponden al menos a tres experimentos independientes realizados en triplicado y el WB es una muestra representativa de uno de los experimentos. * indica $p < 0.05$.

El efecto represor de PHD1 sobre ATF4 se reproduce en respuesta al tratamiento con taspigargina, utilizado comúnmente como un activador de ATF4 en tanto que inductor del estrés del retículo endoplásmico (Figura V.1.7.4.2).

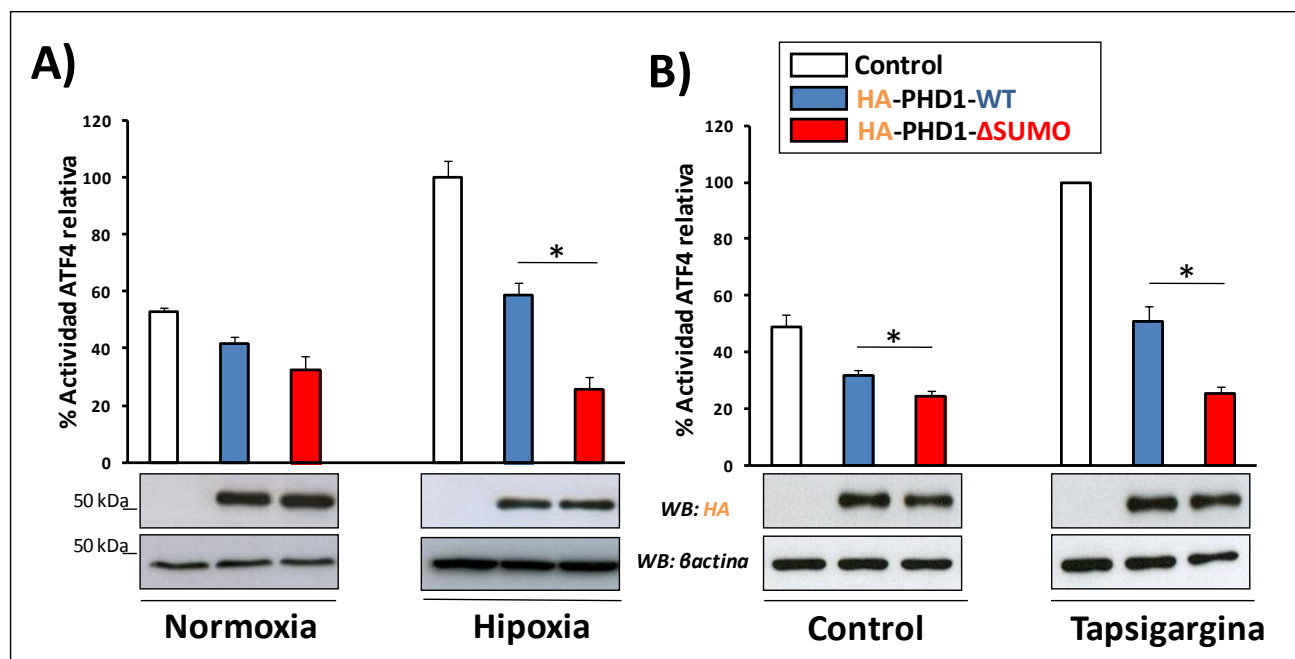


Figura V.1.7.4.2. Efecto del mutante Δ SUMO sobre la actividad ATF4 inducida con hipoxia o taspigargina. Se transfectaron células HeLa, en placas p48, con pcDNA3 (50ng), HA-PHD1-WT (20ng+30ng de pcDNA3) o HA-PHD1- Δ SUMO (30ng+20ng de pcDNA3) junto con pATFx2-LUC (32ng) y SV40- β Gal (32ng) para normalizar la transfección. Las células se incubaron en **A)** hipoxia (1% O₂) o **B)** se trataron con taspigargina (300nM) durante 16h y se midió la actividad luciferasa y β -galactosidasa. Los valores representan el % de la actividad ATF4/ β gal con respecto a células control incubadas en hipoxia o en presencia de taspigargina (100%). En paralelo, se prepararon extractos celulares y se evaluó los niveles de expresión de los diferentes constructos por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-HA. Los resultados corresponden al menos a tres experimentos independientes realizados en triplicado y el WB es una muestra representativa de uno de los experimentos. * indica p < 0.05.

Por otra parte, nuestros resultados confirman que el efecto inhibitor de PHD1 sobre ATF4 es dependiente de su actividad hidroxilasa ya que PHD1-WT inhibe la activación de ATF4 inducida por hipoxia pero no por DMOG. Además, la expresión del mutante carente de actividad hidroxilasa (PHD1-H358A) no es capaz de inhibir dicha activación bajo ninguna condición (Figura V.1.7.4.3).

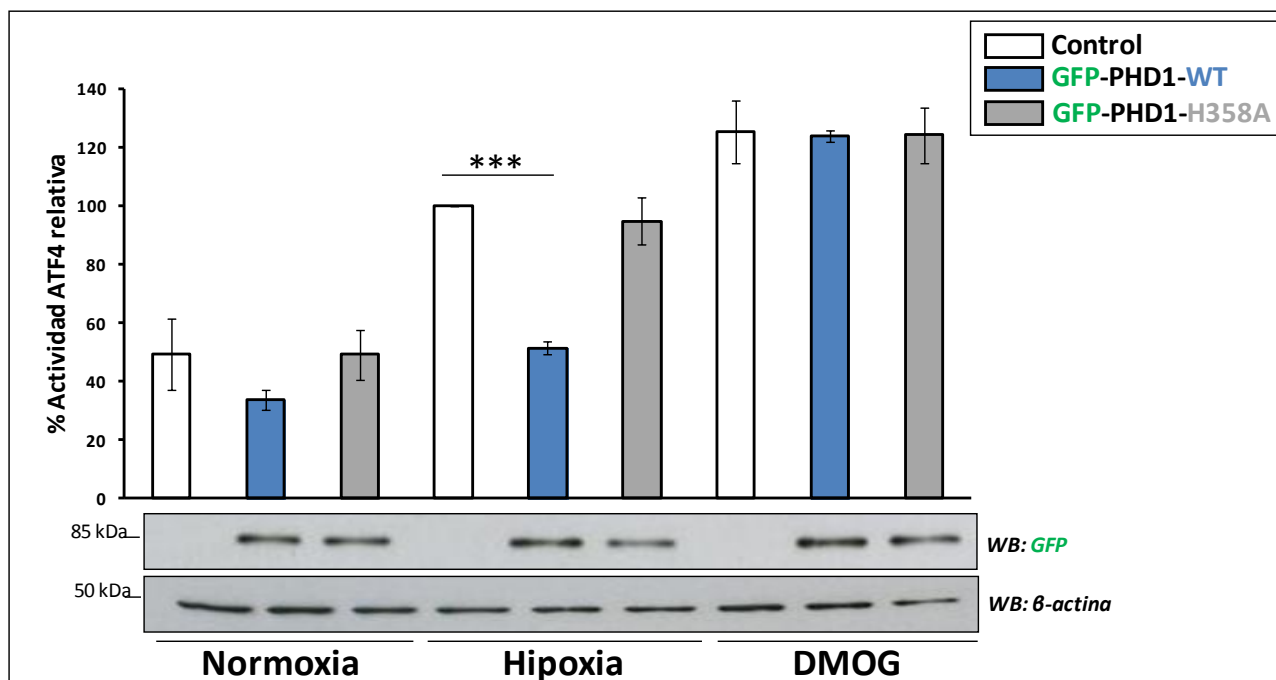


Figura V.1.7.4.3. La represión de ATF4 mediada por PHD1 depende de su actividad hidroxilasa. Se transfectoron células HeLa, en placas p48, con GFP-PHD1-WT, GFP-PHD1-H358A o un plásmido vacío (50ng) junto con pATFx2-LUC (32ng) y SV40-βGal (32ng). Las células se mantuvieron en normoxia, hipoxia (1% O₂) o se trataron con DMOG (1mM) durante 16h y se midió la actividad luciferasa y β-galactosidasa. Los niveles de expresión de los diferentes constructos se evaluaron por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-GFP. Los valores representan el % de la actividad ATF4/βgal con respecto a células control incubadas en hipoxia (100%). Los resultados corresponden al menos a tres experimentos independientes realizados en triplicado y el WB es una muestra representativa de uno de los experimentos. *** indica p<0.001.

Sorprendentemente, y a pesar del efecto inhibitor sobre la actividad transcripcional, se ha descrito que PHD1 estabiliza ATF4 (Hiwatashi et al., 2011). Por ello, decidimos evaluar directamente si la SUMOilación de PHD1 afecta los niveles de expresión de ATF4. En nuestras condiciones experimentales y contrariamente a los resultados publicados, los niveles de expresión de ATF4 no se ven afectados por la sobre-expresión de PHD1-WT o PHD1-ΔSUMO y ello en respuesta a diferentes tratamientos (Figura V.1.7.4.4). Sin embargo, estos resultados confirman que la SUMOilación de PHD1 se opone al efecto represor de PHD1 sobre ATF4 se trate bien de la proteína endógena o expresada ectópicamente.

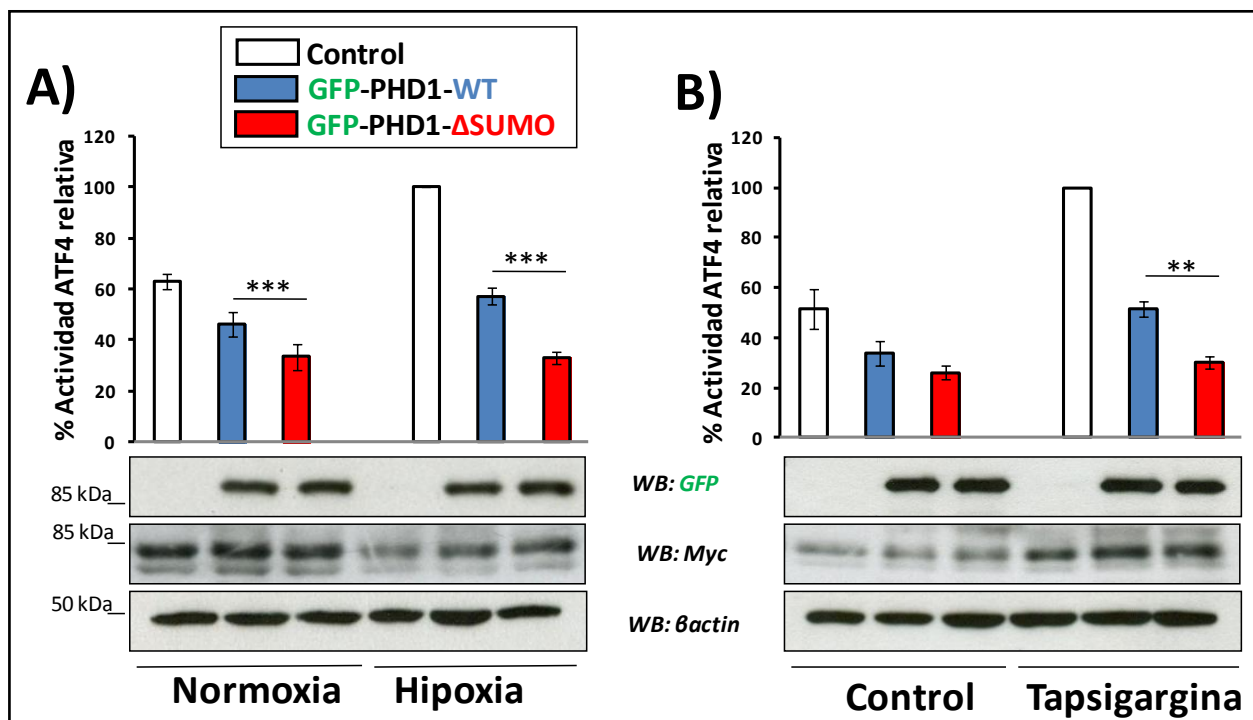


Figura V.1.7.4.4. PHD1 no afecta los niveles de expresión de ATF4. Células HeLa se transfectaron, en placas de 35mm, con Myc-ATF4 (0,5μg), GFP-PHD1-WT, GFP-PHD1-ΔSUMO o un plásmido vacío (1μg) junto con pATF4-LUC (32ng) y SV40-βgal (32ng). Las células se incubaron durante 16 horas en **A)** hipoxia (1% de O₂) o **B)** se trataron en presencia de tapsigargina (300nM) y se midió la actividad luciferasa y β-galactosidasa. Los niveles de expresión de los diferentes constructos se evaluaron por Western Blot utilizando anticuerpos anti-GFP y anti-Myc. Los valores representan el % de la actividad ATF4/βgal con respecto a células control incubadas en hipoxia o en presencia de tapsigargina (100%). Los resultados corresponden al menos a tres experimentos independientes realizados en triplicado y el WB es una muestra representativa de uno de los experimentos. ** indica p<0.01 y *** indica p<0.001.

La activación de ATF4 inhibe mTORC1 bajo condiciones de privación de aminoácidos (Jin et al., 2009; Whitney et al., 2009). Además las PHDs se han descrito como sensores de aminoácidos que regulan la activación de mTORC1 (Durán et al., 2013). En base a dichas premisas, se planteó evaluar si la SUMOilación de PHD1 podría jugar un papel en la regulación de la ruta de mTORC1 a través de la modulación de la actividad de ATF4.

En primer lugar, comprobamos que la hipoxia y el tratamiento con tapsigargina inhiben la ruta de mTORC1 (Figura V.1.7.4.5). Sin embargo, ni la expresión de PHD1-WT ni la de PHD1-ΔSUMO influyen en los niveles de fosforilación de S6K y/o S6 utilizados como testigos de la activación de la ruta.

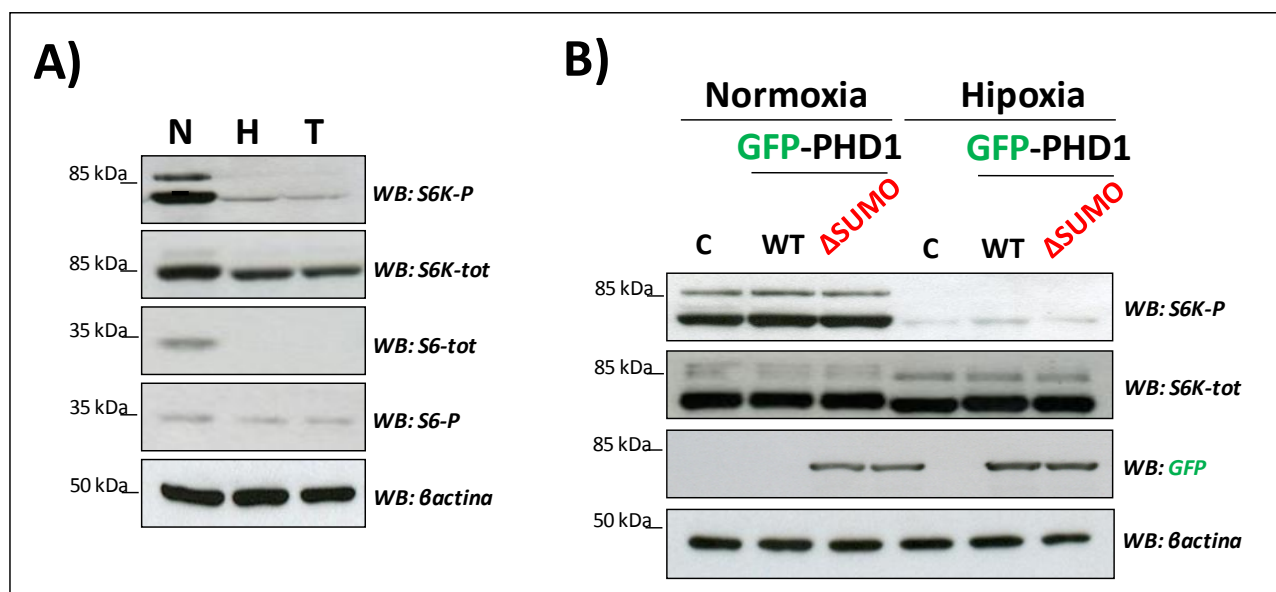


Figura V.1.7.4.5. SUMOilación de PHD1 y su relación con la ruta de mTORC1. **A)** Células HEK293T se incubaron durante 16 horas en hipoxia (H: 1% de O₂) o en presencia de taspigargina (T: 300nM). Transcurrido ese tiempo, las células se lisaron y se evaluaron los niveles de expresión de las proteínas por Western Blot con los anticuerpos indicados. **B)** Se transfectaron células HEK293T con 1 μg de GFP-PHD3-WT (WT), GFP-PHD3-ΔSUMO (ΔSUMO) o un plásmido vacío en placas de 35mm. Las células se incubaron en condiciones de hipoxia (1% de O₂, 16 horas) y se evaluaron los niveles de expresión de las proteínas por Western Blot con los anticuerpos indicados.

V.2 Estudio de PHD3-SUMO y la actividad transactivadora de HIF

V.2.1 Impacto de PHD3-SUMO sobre HIF-1α y/o HIF-2α

Resultados anteriores a mi llegada al laboratorio mostraban claramente que PHD3 es diana de SUMO y que dicha SUMOilación reprime la actividad transactivadora de HIF-1 sin afectar, sin embargo, a la estabilidad de HIF-1α.

Mis primeros pasos en el laboratorio se orientaron a confirmar el efecto de la SUMOilación de PHD3 sobre la actividad transcripcional de HIF-1 *per se*. Para ello, utilizamos el mutante de HIF insensible a la acción de las hidroxilasas: HIF-1αDM (P402/564A). En primer lugar, comprobamos que efectivamente la expresión de PHD3 inhibe la transactivación del gen reportero 3xHRE (Figura V.2.1.1). Además, para nuestra sorpresa demostramos que la represión de la actividad transactivadora de HIF1α-DM mediada por PHD3 es independiente de su actividad hidroxilasa ya que tanto PHD3-WT como el mutante PHD3-H196A reprimen dicha actividad de manera semejante. Por otra parte, de acuerdo con los resultados precedentes, la expresión de PHD3-SUMO2/3 (mutante que mimetiza la SUMOilación constitutiva de PHD3) y PHD3-

Δ SUMO (mutante análogo a PHD1- Δ SUMO en el que las Ks diana de SUMO han sido mutadas por Rs) reprimen más y menos, respectivamente la transactivación mediada por HIF1 α -DM. Es importante resaltar que, sin embargo, ninguno de los constructos de PHD3 analizados afecta los niveles de expresión de HIF1 α -DM (Figura V.2.1.1).

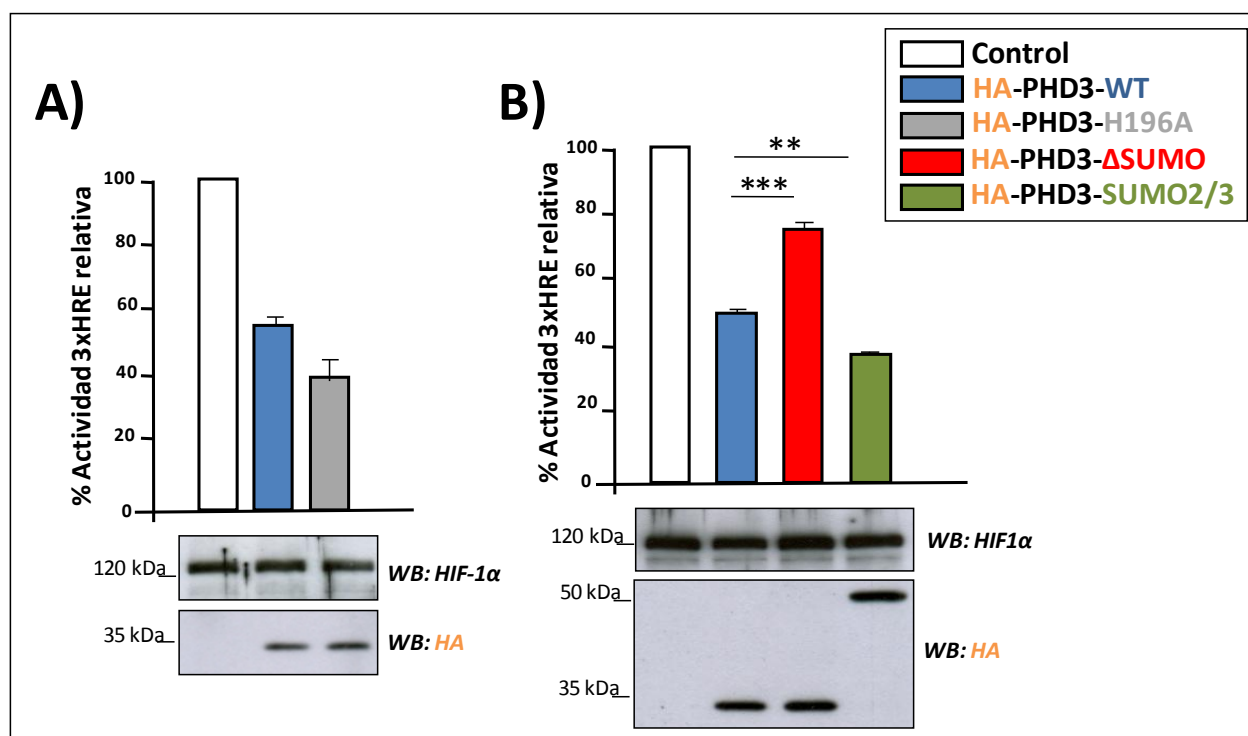


Figura V.2.1.1. La SUMOilación de PHD3 inhibe la actividad transcripcional de HIF-1. A y B) Células HEK293T se transfectaron, en placas de 48 pocillos, con 50ng de Myc-HIF1 α -DM junto con 100ng de los constructos de PHD3 indicados o pcDNA4 y 32ng de los vectores 3xHRE-Luc y CMV- β -gal. Se midió la actividad luciferasa y β -galactosidasa de manera semejante a experimentos anteriores. En paralelo, se prepararon extractos celulares y se analizaron los niveles de expresión de las proteínas por inmunoblot anti-HA o anti-HIF-1 α . Los valores representan el % de la actividad LUC/ β gal con respecto a células control en normoxia (100%). Los resultados corresponden al menos a tres experimentos independientes realizados en triplicado y el WB es una muestra representativa de uno de los experimentos. ** indica $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

En conformidad con estos resultados, el silenciamiento de dos mediadores de la maquinaria de SUMOilación endógena, Ubc9 y SUMO3 incrementa la activación de HIF mediada por hipoxia mientras que el silenciamiento de HIF-1 α (empleado como control interno) inhibe dicha activación (Figura V.2.1.2). Además, el silenciamiento de Ubc9 y SUMO3 inhibe la represión mediada por PHD3 lo que se traduce en un incremento de la actividad transactivadora de HIF1 α -DM (Figura V.2.1.2).

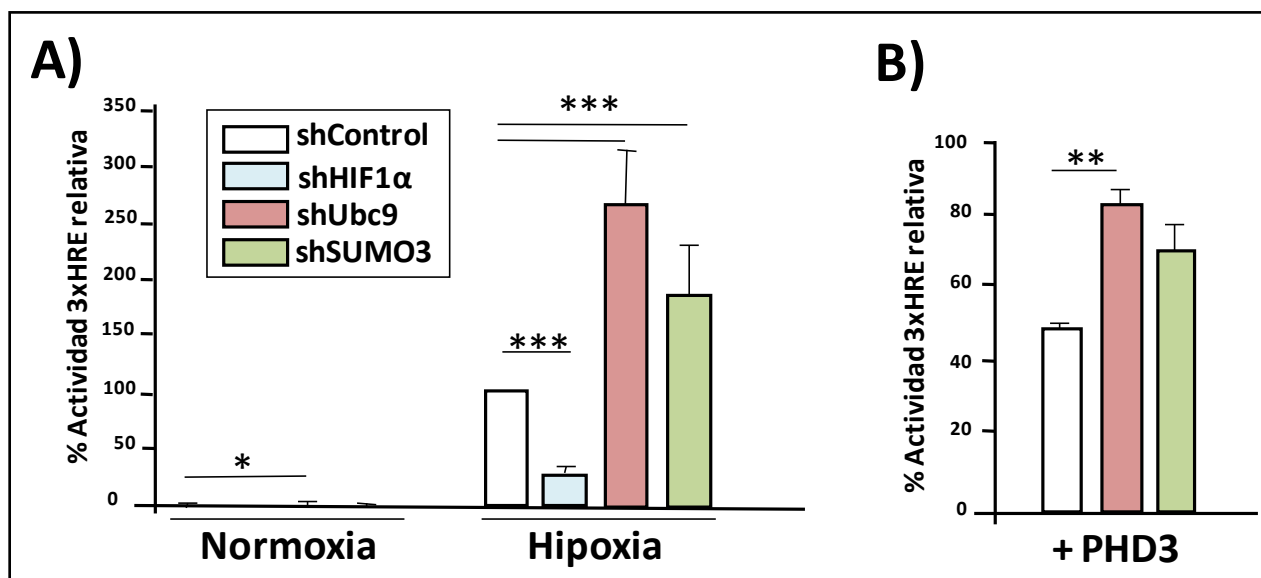


Figura V.2.1.2. La SUMOilación regula la represión transcripcional de HIF mediada por PHD3. **A)** Células HeLa se transfectaron, en placas de 48 pocillos, con los shRNAs (750ng) indicados junto con los plásmidos reporteros 3xHRE-Luc (50ng) y SV40- β gal (25ng). 48 horas tras la transfección, se incubaron las células en normoxia o hipoxia (1% de O₂, 16 horas) y se midió la actividad luciferasa y β -galactosidasa. Los valores representan el % de la actividad HRE/ β gal con respecto a células control incubadas en hipoxia (100%). **B)** Células HeLa se transfectaron con la batería de shRNAs indicada como en A), a las 24h y por el mismo periodo de tiempo, las células se seleccionaron en presencia de puromicina (3 μ g/ml); por último, las células se transfectaron de nuevo con Myc-HIF1 α -DM (500ng) junto con 250ng de PHD3 o pcDNA4 y 100ng del vector reportero 3xHRE-Luc y 50ng de SV40- β -gal para normalizar la reacción. Los valores representan el % de la actividad HRE/ β gal con respecto a células control en normoxia (100%). Los resultados corresponden al menos a tres experimentos independientes realizados en triplicado. * indica p<0.05, ** indica p<0.01 y *** indica p<0.001.

Para sustentar los resultados anteriores, se analizó el impacto de la SUMOilación de PHD3 en la expresión de dos dianas endógenas de HIF-1 como son *CA9* y *GLUT1*, midiendo los niveles por RT-qPCR. Los resultados obtenidos confirman el papel represor de los conjugados de PHD3-SUMO (Figura V.2.1.3).

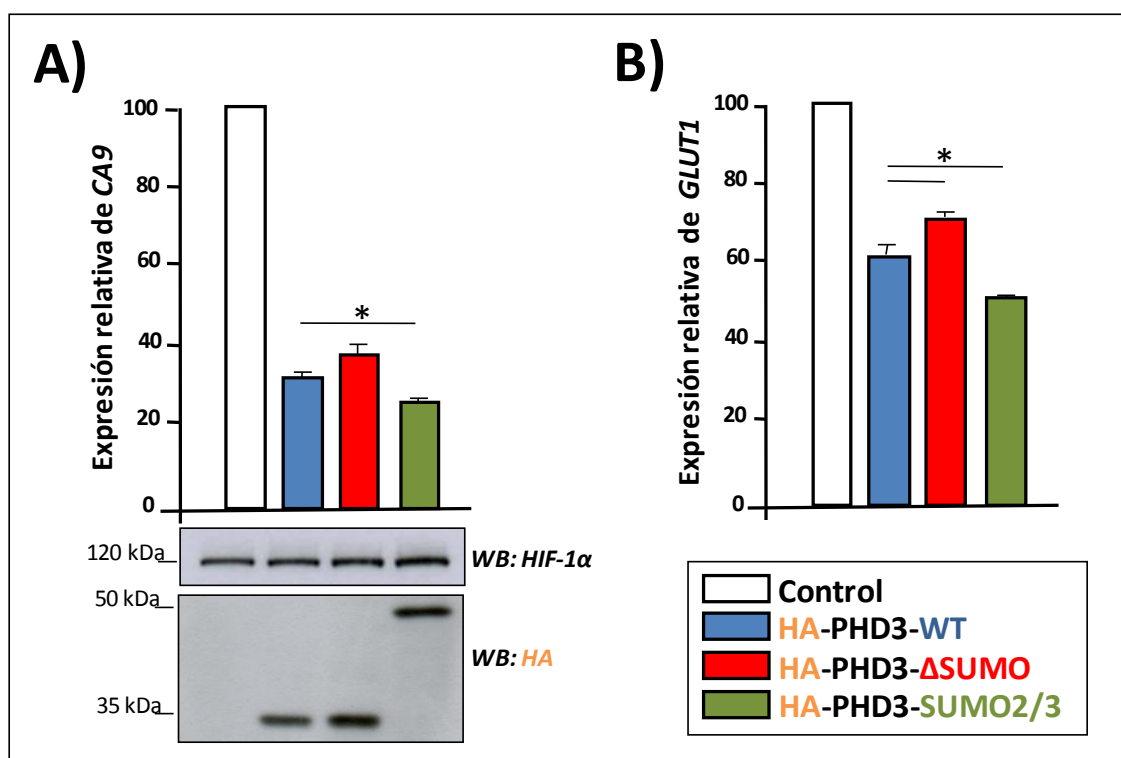


Figura V.2.1.3. La SUMOilación de PHD3 reprime la expresión de genes regulados por HIF-1. Se transfectaron, en placas de 35mm, células HEK293T con Myc-HIF1α-DM (500ng), pBABPuro (500ng) y las construcciones de PHD3 indicadas (1μg). Tras 48 horas de selección en presencia de puromicina (3μg/ml) se extrajo el ARNm y se analizó la expresión endógena de **A)** CA9 y **B)** GLUT1 por RT-qPCR. Los valores representan el % del ARNm con respecto a células control en normoxia (100%). Se evaluaron los niveles de expresión de las proteínas por Western Blot con los anticuerpos indicados. Los resultados corresponden al menos a tres experimentos independientes y el WB es una muestra representativa de uno de los experimentos. * indica $p < 0.05$.

También analizamos si el efecto represor de PHD3-SUMO sobre HIF-1 es extrapolable al complejo HIF-2. De modo análogo a los experimentos anteriores, utilizamos el mutante de HIF-2α insensible a la acción de hidroxilasas: HIF2α-DM (P405/531A). Como se observa en la Figura V.2.1.4, la expresión de PHD3 reprime la actividad transactivadora de HIF-2. Sin embargo, este efecto parece ser independiente de la SUMOilación de PHD3 ya que los mutantes HA-PHD3-ΔSUMO y HA-PHD3-SUMO2/3 se comportan de manera semejante.

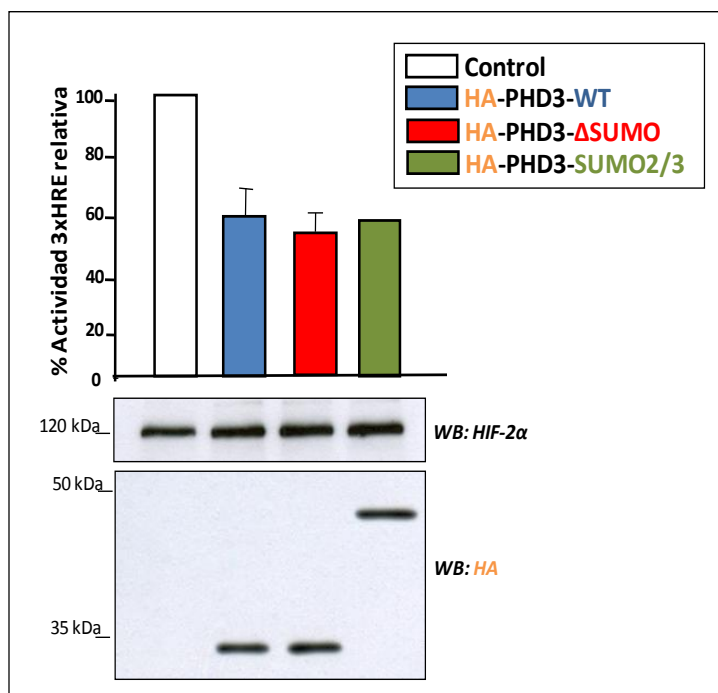


Figura V.2.1.4. La SUMOilación de PHD3 no regula la actividad transactivadora de HIF-2. Se transfectaron células HEK293T, en placas de 48 pocillos, con Myc-HIF2 α -DM (50ng) junto con 100ng de los constructos de PHD3 indicados o pcDNA4 y 32ng del vector reportero 3xHRE-Luc y CMV- β -gal. Transcurridas 24 horas, se midió la actividad luciferasa y β -galactosidasa. Los valores representan el % de la actividad HRE/ β gal con respecto a células control en normoxia (100%). Se evaluaron los niveles de expresión de las proteínas por Western Blot con los anticuerpos indicados. Los resultados corresponden al menos a tres experimentos independientes realizados en triplicado y el WB es una muestra representativa de uno de los experimentos.

V.2.2 Análisis de la región diana del efecto represor

Por otra parte, con el fin de determinar qué región de HIF-1 α se ve afectada por la acción de PHD3-SUMO, generamos una forma truncada de HIF1 α -DM que carece del dominio de transactivación C-terminal HIF1 α -DM⁶⁵⁷ y posteriormente, evaluamos el efecto represor de PHD3-SUMO sobre dicho constructo. Los resultados de la Figura V.2.2 indican que PHD3-SUMO afecta la actividad transactivadora de HIF1 α -DM⁶⁵⁷ de manera semejante a HIF1 α -DM y sugieren que el efecto represor de PHD3-SUMO es independiente del dominio CTAD de HIF-1 α .

Asimismo, se generó la construcción pBIND-HIF-1 α -ODDD-DM que expresa el dominio de unión al ADN de Gal4 (Gal4-DBD) fusionado al ODDD (aminoácidos 344 a 582) de HIF-1 α que contiene el dominio de transactivación N-terminal. Tal y como muestran los resultados de la Figura V.2.2, la expresión de un reportero bajo el control de la secuencia de unión al ADN GAL4 (p4xGal-Luc) y la actividad transactivadora del dominio NTAD de HIF-1 α no se ve afectada por la expresión de PHD3. De estos experimentos

concluimos que el NTAD es necesario pero no suficiente para que PHD3-SUMO ejerza su efecto represor sobre la actividad de HIF-1.

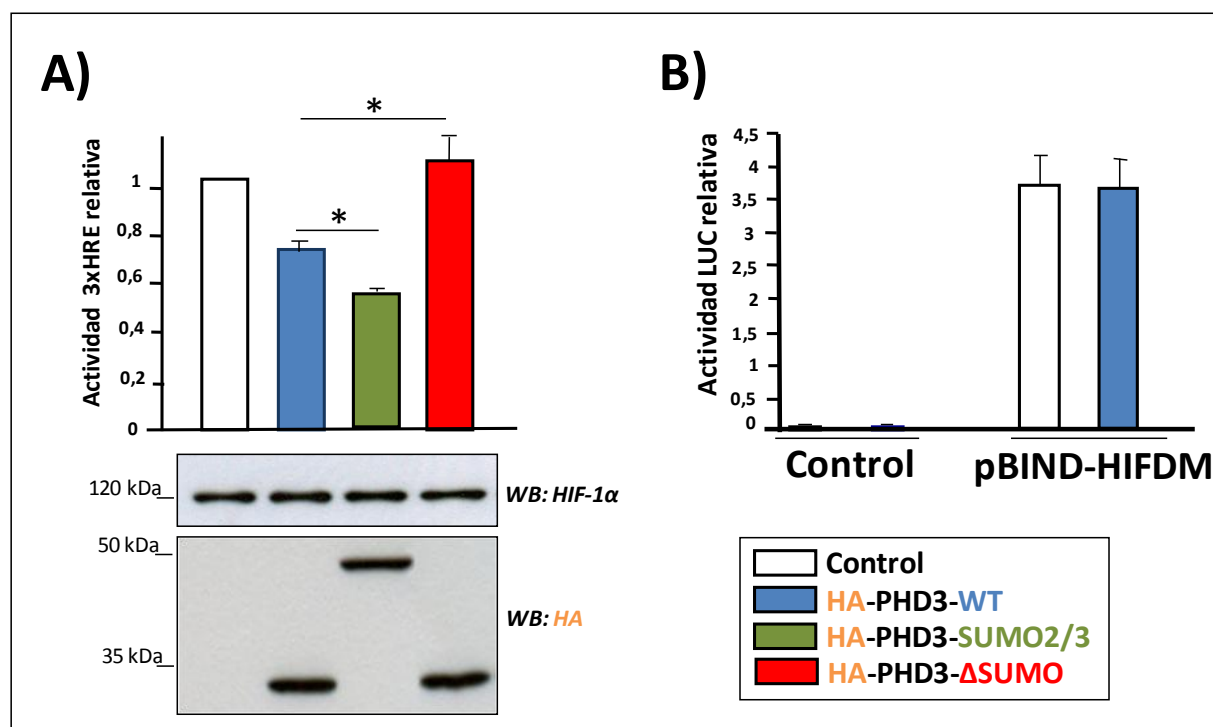


Figura V.2.2. Efecto represor de PHD3-SUMO sobre formas truncadas de HIF1α-DM. **A)** Se transfectaron células HEK293T, en placas de 48 pocillos, con Myc-HIF-1αDM⁶⁵⁷ (50ng) junto con los constructos de PHD3 indicados (100ng) o pcDNA4 y el vector reportero 3xHRE-Luc (32ng) y CMV-β-gal (32ng). Transcurridas 24 horas, se midió la actividad luciferasa y β-galactosidasa. Los valores representan la actividad HRE/βgal con respecto a células control en normoxia. Se evaluaron los niveles de expresión de las proteínas por Western Blot con los anticuerpos indicados. **B)** Células HEK293T se transfectaron, en placas de 48 pocillos, con los plásmidos control o pBIND-HIF-1α-ODDD-DM (50ng) junto con PHD3-WT o pcDNA4 (150ng) y los plásmidos reporteros p4xGal4-Luc (25ng) y CMV-β-gal (75ng). Transcurridas 24 horas, se midió la actividad luciferasa y β-galactosidasa. Los valores representan la actividad LUC/βgal con respecto a células control. Los resultados corresponden al menos a tres experimentos independientes realizados en triplicado y el WB es una muestra representativa de uno de los experimentos. * indica p<0.05

V.2.3 Impacto de la SUMOilación en la interacción con HIF-1α

El efecto represor de PHD3-SUMO podría explicarse asumiendo que la SUMOilación de PHD3 podría desencadenar cambios en la afinidad de PHD3 por HIF-1α. Por ello evaluamos la interacción de HIF-1α-DM con los diferentes mutantes de PHD3 mediante ensayos de coIP.

Los resultados muestran que PHD3-WT y PHD3- Δ SUMO interactúan con HIF1 α -DM de forma semejante (Figura V.3.1). Por el contrario, constatamos de forma reiterada una disminución en la interacción de PHD3-SUMO2/3 e HIF1 α -DM.

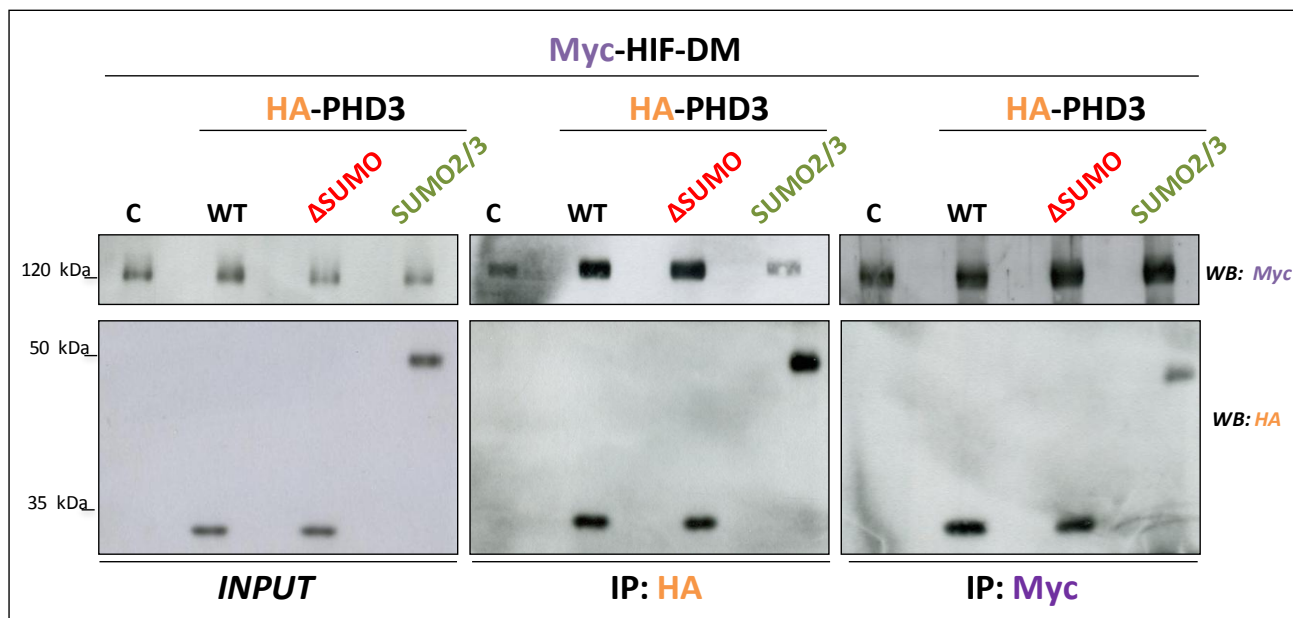


Figura V.2.3. Evaluación del impacto de la SUMOilación de PHD3 en la interacción con HIF-1 α . Células HEK293T fueron transfectadas, en placas de 100mm, con 3 μ g de Myc-HIF-DM y 6 μ g de las diferentes construcciones de HA-PHD3 o pcDNA3. 24 horas tras la transfección las células se recogieron en tampón de lisis y los inmunoprecipitados se analizaron por Western Blot con los anticuerpos indicados. El *input* corresponde a un 1/50 de los extractos utilizados para la inmunoprecipitación.

VI. Discusión

PHD1, 2 y 3 son los «sensores» de oxígeno y controlan la activación de la cascada de HIF al regular la estabilidad de la subunidad HIF- α . Un número creciente de estudios resaltan la existencia de diferencias entre las PHDs en cuanto a sus características, regulación y función. Además, es cada vez mayor el número de dianas directas e indirectas atribuidas a cada PHD y *partners* específicos que regulan sus funciones. Las PTMs permiten la modificación dinámica de las propiedades de una proteína adaptándola a las necesidades inmediatas de la célula.

La presente tesis se ha centrado en la evaluación de la SUMOilación de las PHDs, en especial de PHD1 y PHD3, y sus consecuencias fisiológicas.

VI.1 PHD1 como sustrato de SUMO

Nuestro trabajo muestra que PHD1 se SUMOilá (Figura V.1.1) con un patrón muy característico en el que se aprecian dos bandas de alto peso molecular. La mutación de las Ks 118/120 y K361 conlleva la pérdida de las bandas superior e inferior, respectivamente, mientras que su mutación conjunta nos permitió obtener el mutante PHD1- Δ SUMO (Figura V.1.2.4). Cabe mencionar que en los ensayos de SUMOilación *in cellulo* purificamos la forma no modificada de PHD1. Como se ha mencionado anteriormente, las PHDs unen Fe^{2+} y otros iones metálicos divalentes a su lugar activo. Por ello, la unión directa de PHD1 a la columna de níquel empleada en la purificación los conjugados PHD1-SUMO justificaría la presencia de PHD1 NM en nuestros ensayos. Acorde con esta argumentación, no detectamos la forma NM de PHD1-Nter que carece del dominio de unión a Fe^{2+} (Figura V.1.2.3).

Los conjugados de PHD1-SUMO encajan con el incremento teórico correspondiente a la adición de dos (banda de 70 kDa) o tres (banda de 80 kDa) SUMOs. En base a estos resultados, proponemos la presencia de una cadena de 2 SUMOs sobre la K 361 y 1 SUMO sobre las Ks 118 y/o 120 aunque es cierto que no podemos descartar otras posibles interpretaciones. Para confirmar esta hipótesis, y en ausencia de anticuerpos específicos que reconozcan cadenas de SUMO, que sí existen en el caso de cadenas de poli-ubiquitina, podríamos sobre-expresar un mutante de SUMO2/3 en la lisina 11 responsable de la formación de las cadenas de SUMO (Fujimuro et al., 1994; Newton et al., 2008; Tatham et al., 2001). Este mutante nos permitiría evaluar si se produce un cambio en el patrón de migración de las formas conjugadas. Además, en nuestros experimentos, hemos mutado conjuntamente las Ks 118 y 120 pero puede que únicamente una de ellas sea realmente modificada por SUMO. Hay que tener en cuenta que el sistema *in cellulo* utilizado es un tanto «forzado» y no nos permite discernir entre residuos dada su proximidad. Por otra parte, nuestros resultados no nos permiten concluir sobre la existencia individualizada o no de 2 conjugados PHD1-SUMO. El análisis por espectrometría de masas en tándem podría facilitarnos la identificación del tipo de

modificación y de los residuos SUMOilados.

La SUMOilación de una proteína puede verse afectada por el proceso de fosforilación (Desterro et al., 199; Hietakangas et al., 2003; Müller et al., 2000; Spengler et al., 2002). PHD1 es fosforilada en la serina 130 por varias CDKs en función del ciclo celular. Cabría analizar si la fosforilación de PHD1 afecta su SUMOilación observando la formación de conjugados PHD1-SUMO. También sería interesante analizar si existe una señalización cruzada entre ambas modificaciones a lo largo del ciclo celular.

Nuestros datos indican que la enzima Ubc9 es limitante en la reacción de SUMOilación de PHD1 (Figura V.1.1). Ubc9 dirige directamente la SUMOilación de sustratos que presentan un motivo de SUMOilación consenso y cuya interacción es inusualmente estable como RanGAP1 (Bernier-Villamor et al., 2002; Pichler et al., 2005). Sin embargo, varios estudios apuntan a la contribución necesaria de una E3-SUMO ligasa cuando las concentraciones de Ubc9 son limitantes (Lin et al., 2002; Truong et al., 2011). En este sentido, se ha descrito que en tales condiciones, la actividad E3-SUMO ligasa coordina el enlace tioéster Ubc9-SUMO en una conformación óptima para la catálisis sin que se produzca necesariamente un contacto directo con el sustrato, como en el caso de RanBP2 (Reverter et al., 2005; Tatham et al., 2005; Truong et al., 2011). Por ello, consideramos que sería interesante identificar la enzima E3-SUMO ligasa y la maquinaria de SUMOilación de PHD1. En este trabajo hemos intentado identificar la(s) deSUMOilasa(s) específicas(s) de PHD1. Con tal fin, se realizaron ensayos de SUMOilación tras el silenciamiento de cada una de las isoformas de las SENPs. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes y por ello no han sido incluidos en el presente manuscrito.

VI.2 Consecuencias de la SUMOilación de PHD1

VI.2.1 PHD1-SUMO y su localización celular

PHD1 presenta una NLS bipartita siendo el *cluster* de aminoácidos 118-120 un componente esencial de la misma (Steinhoff et al., 2009; Yasumoto et al., 2009). Los mutantes PHD1-K118/120R y PHD1- Δ SUMO sugieren un posible papel de SUMO en la regulación de la localización nuclear de PHD1 (Figura V.1.6.2). Además, la deSUMOilación de PHD1 incrementa su localización citoplasmática (Figura V.1.6.4 y Figura V.1.6.5) excluyendo un posible efecto inespecífico debido a la mutación K/R (Figura V.1.6.4). Por otra parte, nuestros resultados muestran que la SUMOilación de PHD1 impide su exporte al citoplasma (Figura V.1.6.7) sin afectar su importe nuclear (Figura V.1.6.6). La formación de conjugados PHD1-SUMO podría ocurrir durante el importe nuclear (gracias a la actividad de una E3-SUMO ligasa asociada al poro nuclear, como RanBP2) o dentro del núcleo (gracias a la actividad de E3-SUMO ligasas nucleares, como PIAS) (Kotaja et al., 2002; Miyauchi et al., 2002). Nuevamente, se hace necesario el conocimiento de los mecanismos

implicados en la SUMOilación de PHD1 para esclarecer estos supuestos.

Desconocemos el mecanismo particular por el cual la SUMOilación de PHD1 impide el exporte de PHD1 del núcleo. La literatura científica aporta varios ejemplos de proteínas nucleares cuyo exporte al citoplasma es inhibido por la SUMOilación de su NLS (Lin et al., 2003a; Saito et al., 2010; Truong et al., 2012). La SUMOilación de SENP1, por ejemplo, favorece su unión a diversas proteínas como HDAC, ICP0 o PML que secuestran SENP1 en el núcleo (Bailey y O'Hare, 2004). Además, las E3-SUMO ligasas pueden retener, por interacción directa, proteínas dianas en el núcleo. En este sentido, se ha descrito la SUMOilación e interacción de ErbB4 y de la proteína E1 del virus del papiloma humano con las E3-SUMO ligasas de la familia PIAS (Rangasamy et al., 2000; Rosas-Acosta et al., 2005; Sundvall et al., 2012). Por otro lado, también se ha propuesto que la SUMOilación en la NLS de actina impide estéricamente la unión de exportinas al NES de esta proteína previniendo su exporte al citoplasma (Hofmann et al., 2009). El análisis de la secuencia de PHD1 con el servidor de predicción topológica NetNes 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) descarta la presencia de un posible NES por lo que parece improbable que PHD1-SUMO impida la unión de exportinas que medien su transporte al citoplasma. No obstante, los resultados obtenidos con la LMB suscitan la implicación obligada de una proteína con una NES en el proceso de transporte núcleo-citoplasmático de PHD1. Además, al igual que PHD1, numerosas proteínas nucleares contiene un SIM en su estructura que podría promover la retención en el núcleo gracias a la interacción con proteínas SUMOiladas (Namanja et al., 2012; Song et al., 2004; Song et al., 2005). En este sentido, nuestros resultados preliminares mostraron una mayor acumulación en el citoplasma del mutante SIM de PHD1 en comparación con la construcción WT (datos no mostrados). La SUMOilación de PHD1 podría favorecer su retención en el núcleo gracias a la interacción con una o más proteínas entre las que no podemos descartar alguno los substratos o *partners* identificados para PHD1.

VI.2.2 Consecuencias de la SUMOilación de PHD1 sobre sus dianas

De las posibles dianas de PHD1 analizadas, nuestros resultados excluyen la contribución de PHD1-SUMO a la regulación de la actividad de HIF en respuesta a hipoxia (Figura V.1.7.1). Estos resultados confirman observaciones previas en las que se demuestra que la localización intracelular de PHD1 no afecta la actividad de HIF-1 (Yasumoto et al., 2009). Sin embargo, los conjugados PHD1-SUMO contribuyen a la regulación de dianas de PHD1 tales como: ciclina-D1, ER α /PR y ATF4, no pudiendo descartar la implicación de PHD1-SUMO en la regulación de otras dianas como Cep192 o IKK β . En conjunto, nuestros resultados sugieren que la SUMOilación proporciona un mecanismo de control de la actividad de PHD1 hacia substratos específicos. De manera semejante, la fosforilación de PHD1 en S130 ejerce efectos contrapuestos en dos dianas de PHD1, al disminuir e incrementar su actividad sobre HIF-1 α y Cep192,

respectivamente (Ortmann et al., 2016).

VI.2.2.1 Ciclina-D1 y ER α /PR

Datos preliminares de nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio de la Dra. MdM Vivanco vinculan la hipoxia y el silenciamiento de PHD1 con la inhibición de la expresión de ER α . De manera semejante, Zhang y colaboradores (2009) han descrito que la actividad de PHD1 influye positivamente en la expresión de ciclina-D1 que es inducido por ER α y proporciona un mecanismo de retroalimentación positiva al activar a su vez a ER α (Neuman et al., 1997; Zhang et al., 2009; Zwijsen et al., 1997). Por todo ello, decidimos analizar el papel de la SUMOilación de PHD1 en la regulación de ciclina-D1 y ER α . Nuestros resultados revelan que dicha SUMOilación es necesaria para inducir los niveles de expresión de ciclina-D1, ER α y su diana PR (V.1.7.3.1), favoreciendo la proliferación celular en la línea T47D (Figura V.1.7.3.2). Para profundizar en este estudio, se generaron líneas estables de los diferentes mutantes de PHD1 en la línea celular T47D. Sin embargo, esta línea de investigación se vio frustrada por la pérdida de expresión de los mutantes en los clones seleccionados.

Desconocemos por el momento el mecanismo por el cual la SUMOilación de PHD1 afecta los niveles de ciclina-D1 y ER α /PR y si dicha regulación es independiente o no. No obstante, el factor de transcripción FOXO3a podría ser un firme candidato mediador y resultaría muy interesante evaluar el impacto de PHD1-SUMO sobre la estabilidad de FOXOa. En efecto, FOXO3a reprime la transcripción de ciclina-D1 y se ha demostrado que PHD1 hidroxila FOXO3a y promueve su degradación en el proteasoma, favoreciendo de este modo la expresión de ciclina-D1 (Zheng et al., 2014). Además, se ha implicado a FOXO3a en la inducción de la expresión y la actividad de ER α (Cullinan y Diehl, 2006; Ferber et al., 2012; Guo y Sonenshein, 2004; Jensen et al., 2011).

PHD1 y ciclina-D1 median la proliferación de tumores mamarios inducibles por estrógenos (Seth et al., 2002; Zhang et al., 2009). Sin embargo, la disminución en la proliferación celular y en la expresión de ciclina-D1 que se produce tras la pérdida de PHD1 no se restringe a tumores de mama (Zhang et al., 2009). Por ello, la regulación de ciclina-D1 por PHD1-SUMO podría ser extrapolable a líneas celulares independientes de estrógeno e incluso a otros tipos tumorales.

VI.2.2.2 ATF4

La SUMOilación de PHD1 se opone al efecto represor de PHD1 sobre la activación de ATF4 inducida por hipoxia o taspigargina (Figuras V.1.7.4.1 y V.1.7.4.2), modulando la actividad de la proteína endógena o sobre-expresada (Figura V.1.7.4.3). Además, nuestros resultados sugieren que las consecuencias de la SUMOilación de PHD1 van más allá de un efecto sobre su localización celular ya que el mutante K118/120R

se comporta como la proteína WT en su regulación de ATF4.

Sin embargo, nuestros resultados indican que PHD1 y PHD1-SUMO no afectan los niveles de expresión de ATF4. Por otro lado, fuimos incapaces de inducir la expresión de ATF4 en hipoxia, como se ha publicado, aunque sí con taspigargina (Köditz et al., 2009).

La actividad hidroxilasa de PHD1 es necesaria en la modulación de la actividad de ATF4 por PHD1. Sin embargo, no se ha podido confirmar que ATF4 sea diana directa PHD1 y eso que interaccionan y co-localizan en el núcleo (Hiwatashi et al., 2009). La SUMOilación de PHD1 podría modular dicha interacción y promover de este modo la actividad transcripcional de ATF4. PHD1-SUMO también podría promover la asociación con algún co-activador de ATF4 como p300, Runx2, Nrf2 y Zhangfei, o asociarse y secuestrar co-represores como FIAT o Mitosin/CENP-F (Cullinan y Diehl, 2006; Hogan et al., 2006; Lassot et al., 2005; Xiao et al., 2005; Yu et al., 2005; Zhou et al., 2005). Para comprobar esta hipótesis sería muy interesante analizar por coIP y/o FRET la interacción de los diferentes mutantes de PHD1 y ATF4 incluyendo sus co-activadores y/o co-represores. Además, nuestros resultados sugieren que PHD1-SUMO no afecta la ruta mTORC1 (Figura V.1.7.4.5) aunque sería interesante abordar el impacto sobre la autofagia, en la cual se ha implicado claramente PHD1 (Durán et al., 2013). También sería interesante estudiar la implicación de PHD1-SUMO en la función mitocondrial vía ATF4 puesto que se han hallado evidencias de que ATF4 favorece la adaptación metabólica de células de tumores de colon al inhibir la síntesis de ATP por la mitocondria, además de regular la expresión de otros genes mitocondriales (Martínez-Reyes et al., 2012). Finalmente, se ha descrito que ATF4 induce la expresión de VEGF en condiciones de privación de aminoácidos o glucosa y es esencial durante la osteogénesis (Zhu et al., 2013). En este sentido, PHD1-SUMO podría regular la homeostasis del hueso al favorecer la expresión de VEGF dependiente de ATF4.

VI.3 Consecuencias de la SUMOilación de PHD3

El presente trabajo profundizó en los mecanismos implicados en la represión de la actividad transcripcional de HIF por PHD3-SUMO. Los resultados en su conjunto muestran claramente que PHD3 desempeña un doble papel en la regulación de HIF: por un lado, regula la estabilidad de HIF- α a través de un mecanismo dependiente de su actividad hidroxilasa y por otra parte, PHD3 regula la actividad transactivadora de HIF-1 por un mecanismo independiente de su actividad hidroxilasa pero dependiente de la SUMOilación de PHD3 (Figura V.2.1.1). Además, dicha SUMOilación no afecta la actividad transcripcional de HIF-2 (Figura V.2.1.4). Estos resultados sustentan de nuevo la hipótesis de la SUMOilación como un mecanismo que regula la afinidad por ciertos substratos. Por ello, proponemos que la SUMOilación de PHD3 contribuye a la especificidad génica de las isoformas de HIF- α . No obstante, se necesitan estudios

complementarios en los que se analice el impacto de la SUMOilación de PHD3 sobre las diferentes dianas descritas en la literatura como β/γ -actina, IKK β , el receptor β -adrenérgico, PKM2 o HCLK2. Por otra parte, resta por esclarecer el mecanismo subyacente a dicha regulación. Estudios preliminares de nuestro laboratorio indican que la SUMOilación de PHD3 disminuye la interacción de PHD3 con HIF-1 α (Figura V.2.3) lo que podría favorecer la interacción directa de HIF-1 α con represores transcripcionales como MORG1 (Hopfer et al., 2006).

La regulación de la actividad de HIF se produce en gran medida a través de los dominios NTAD y CTAD. Ambos dominios son necesarios para la máxima actividad del complejo transcripcional HIF. Sin embargo, se ha descrito que el CTAD regula preferentemente la transactivación de genes comunes a HIF-1 α e HIF-2 α (*VEGF*, *GLUT1*, *ADM*...), mientras que el NTAD sería responsable de la selectividad génica a través del reclutamiento de co-factores transcripcionales que reconocen de manera diferencial a HIF-1 α y HIF-2 α (Aprelikova et al., 2006; Ema et al., 1999; Dayan et al., 2006; Hu et al., 2007; Lau et al., 2007). Acorde con el efecto específico de PHD3-SUMO sobre HIF-1, nuestros resultados indican que el dominio CTAD no es necesario mientras que el dominio NTAD si lo aunque se ha revelado insuficiente en dicha regulación (Figura V.2.2). Por ello, es probable la participación de regiones adicionales, presumiblemente los dominios HLH y PAS. En efecto, los dominios HLH y PAS de HIF- α también contribuyen a la determinación de la especificidad génica al interactuar directamente con co-activadores de la transcripción (Pawlus et al., 2013). STAT3, que interacciona con los dominios NTAD, HLH y PAS de HIF-1 α ; y USF2, que interacciona con el dominio NTAD de HIF-2 α son dos ejemplos de estos co-factores transcripcionales (Pawlus et al., 2013).

Nuestros resultados parecen apoyar evidencias previas de que el estado deSUMOilado de múltiples componentes de la cascada de hipoxia favorecen la activación de HIF (Berta et al., 2007; Bouras et al., 2005; Cheng et al., 2007; Girdwood et al., 2003; Huang et al., 2009; Kang et al., 2010; Kuo et al., 2005; van Hagen et al., 2010). De acuerdo con esta premisa, el silenciamiento de Ubc9 y SUMO3 incrementa la activación de HIF inducida por hipoxia (Figura V.2.1.2.A). Es más, el silenciamiento de Ubc9 y SUMO3 es capaz de inhibir la represión de la actividad de HIF mediada por PHD3 (Figura V.2.1.2.B), confirmando que el estado deSUMOilado de PHD3 se correlaciona con la actividad máxima de HIF.

IV.4 Modulación de la SUMOilación de PHD1 y PHD3 por hipoxia

La deSUMOilación de PHD1 y PHD3 en condiciones de hipoxia discrepa respecto a la idea general de que la hipoxia incrementa la SUMOilación global (Comerford et al., 2003; Shao et al., 2004). Además, la hipoxia afecta la SUMOilación de PHD1 y PHD3 de manera diferencial. La SUMOilación de PHD1 disminuye en hipoxia independientemente de que se trate de una hipoxia aguda o crónica (Figura V.1.4.1). Sin embargo,

nuestro laboratorio ha descrito que los niveles de SUMOilación de PHD3 disminuyen en una hipoxia aguda mientras que en hipoxia crónica los niveles de PHD3-SUMO se recuperan alcanzando niveles semejantes a normoxia (Núñez-O'Mara et al., 2015). En ambos casos, la modulación de la SUMOilación de PHD1 y PHD3 por hipoxia no se debe a la inhibición de la actividad hidroxilasa (Figura V.1.4.3; Núñez-O'Mara et al., 2015). Desconocemos, sin embargo, si la hipoxia afecta a la maquinaria de SUMOilación y deSUMOilación específica de PHD1 y PHD3. También podrían existir señales adicionales, tal vez PTMs, que regulen la formación de conjugados PHD1-SUMO y PHD3-SUMO en función de los niveles de oxígeno.

En hipoxia, la disminución de los conjugados PHD1-SUMO y la actividad hidroxilasa de PHD1 cooperan al efecto inhibitor de la hipoxia sobre la expresión de ciclina-D1 y ER α /PR. Por el contrario, en normoxia, la SUMOilación de PHD1 es necesaria para garantizar la expresión de ciclina-D1 y ER α /PR que depende a su vez de la actividad hidroxilasa de la enzima (Figura V.1.7.3.1). Por otro lado, el efecto de la hipoxia sobre PHD1 con respecto a la activación de ATF4 resulta aparentemente contradictorio. En efecto, la inhibición de PHD1 contribuye a dicha activación mientras que la disminución de los conjugados PHD1-SUMO se opone a este efecto (Figuras V.1.7.4.1 y V.1.7.4.2).

En el caso de PHD3, la disminución en los niveles de conjugados PHD3-SUMO en una hipoxia aguda converge con la inhibición de la actividad hidroxilasa de PHD3 para garantizar la adecuada estabilización y activación del complejo HIF-1, y asegurar de este modo la correcta adaptación celular. En normoxia (con un aporte de oxígeno adecuado) y en una hipoxia prolongada (una vez implementados todos los mecanismos adaptativos necesarios), la actividad hidroxilasa y la SUMOilación de PHD3 aseguran la completa inactivación de HIF-1. La SUMOilación de PHD3 constituye, por consiguiente, un nivel suplementario y complementario de control de HIF-1 que contribuye a la robustez del sistema.

VI.5 Relevancia fisiológica y/o patológica de la SUMOilación de PHD1 y PHD3

Las dianas de PHD1 y PHD3 analizadas en la presente tesis desempeñan un papel clave en el desarrollo del cáncer. Además, son cada vez más numerosas las evidencias que vinculan una desregulación de la maquinaria de SUMOilación con el desarrollo de diversas patologías entre las que destaca el cáncer.

Por un lado, se ha observado que niveles elevados de la enzima Ubc9 en cáncer de ovario y colon y de PIAS1 y PIAS3 en tumores de próstata, pulmón y gliomas promueven la metástasis e invasión celular. Lo mismo sucede con bajos niveles de SENP6 en tumores de mama (Choi et al., 2006; He et al., 2015; Karamouzis et al., 2008; Kessler et al., 2012; Mo et al., 2005; Moschos et al., 2010; Wang y Banerjee, 2004;

Zhu et al., 2010). Por otro lado, se han encontrado niveles elevados de SENP5, SENP3 y SENP1 en cáncer de pulmón, de próstata y colorrectal (Cheng et al., 2006b; Mooney et al., 2010; Wang et al., 2015; Wang y Zhang, 2014). En conjunto, estas evidencias ponen de relieve que los niveles de SUMOilación dentro de una célula deben ser finamente regulados.

Aproximadamente el 70% de los tumores mamarios son ER α (+) y, en general, su expresión se asocia con un mejor pronóstico (Payne et al., 2008). En efecto, la expresión de ER α es característica de tumores bien diferenciados y de buen pronóstico y, por ello, la población de células tumorales con capacidad de auto-renovación, las denominadas CSCs, expresan niveles bajos de este receptor (Shipitsin et al., 2007; Simoes et al., 2011). En este sentido, la hipoxia disminuye la expresión y actividad transcripcional de ER α y se ha demostrado que además incrementa también la proporción de CSCs, al bloquear su diferenciación y favorecer la des-diferenciación de las células tumorales (Cooper et al., 2004; Iriando et al., 2015; Stoner et al., 2002). La pérdida de la SUMOilación de PHD1 inducida por hipoxia podría ser parte del mecanismo de malignidad desencadenado por hipoxia. Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para esclarecer la contribución de los conjugados PHD1-SUMO en el mantenimiento de las CSCs.

Por otro lado, la expresión de ATF4 es elevada en tumores primarios en respuesta a déficit de glucosa y/o aminoácidos, estrés oxidativo, ERE o hipoxia (Ameri et al., 2004; Bi et al., 2005; Wang et al., 2012; Wang et al., 2013). Además, ATF4 se encuentra amplificado en varios tipos de cáncer incluyendo tumores mamarios (Tang et al., 2012). Se trata de tumores muy hipóxicos y agresivos donde ATF4 estimula el crecimiento tumoral y la angiogénesis gracias a la transcripción de genes implicados en la homeostasis de aminoácidos y el balance redox como VEGF, mTORC1 o transportadores de aminoácidos (Singleton y Harris, 2012). Además, ATF4 favorece la adaptación metabólica de células de tumores de colon al inhibir la síntesis de ATP por la mitocondria (Martínez-Reyes et al., 2012). Nuestros resultados sugieren que los conjugados PHD1-SUMO favorecen la progresión tumoral dependiente de ATF4 ya que potencia su actividad transcripcional. No obstante, y en aparente contradicción, en condiciones de hipoxia constatamos una disminución en los niveles de PHD1-SUMO. En este sentido, cabe anticipar que alteraciones de la maquinaria de SUMOilación o deSUMOilación de PHD1 en un contexto tumoral podrían contribuir la activación de ATF4 y la progresión de la enfermedad.

Se ha observado que niveles reducidos de PHD3 en varios cánceres como carcinoma de colon, páncreas, estómago, mama y cáncer de pulmón, se asocian a un estado más agresivo, menos diferenciado y de peor pronóstico (Chen et al., 2011; Peurala et al., 2012; Su et al., 2012; Su et al., 2010; Xue et al., 2010). Es previsible que los niveles de PHD3-SUMO sean bajos coincidiendo con una elevada actividad de HIF, característica de estos tumores. Además, la inhibición de PHD3 permite la expansión de la subpoblación de CSCs CD44⁺CD24^{-/low} (que presentan un potencial elevado de iniciación de la tumorigénesis) por hipoxia en

tumores de mama ER(-) al reducir la expresión de CD24 (Iriondo et al., 2015). La SUMOilación de PHD3 podría afectar a su especificidad hacia CD24 y la disminución en la expresión de CD24 por hipoxia podría ser consecuencia de los niveles bajos de PHD3-SUMO.

Dada la posible correlación entre los niveles de los conjugados de PHD1-SUMO y PHD3-SUMO con el pronóstico tumoral, componentes de la maquinaria de SUMOilación específica de estas PHDs (SEN, SUMO-E3 ligasa...), podrían ser empleados como biomarcadores pronóstico y/o diagnóstico. En este sentido, se ha propuesto SENP3, SENP5 y/o PIAS3 como biomarcadores de mal pronóstico en cáncer de próstata, pulmón y colorrectal (Cheng et al., 2006b; Mooney et al., 2010; Vlachostergios y Papandreou, 2012; Wang et al., 2015; Wang et al., 2014). Así, alteraciones que induzcan la SUMOilación de PHD1, mediante la inhibición de la maquinaria de deSUMOilación o exacerbando la maquinaria de SUMOilación, podrían ser un marcador de buen pronóstico ya que favorecen la expresión de ER α promoviendo, en consecuencia, la diferenciación de las CSCs. En cambio, en tumores dependientes de ATF4 o ciclina-D1 podrían indicar que el tumor es agresivo y de mal pronóstico. Finalmente, la disminución de la maquinaria de SUMOilación y/o el incremento en la maquinaria de deSUMOilación de PHD3 podría emplearse como marcador de angiogénesis y, en consecuencia, de tumores más agresivos en los cuales la actividad de HIF es elevada. Por ello, se requiere de más estudios que identifiquen los niveles de expresión de los diferentes componentes de la maquinaria de SUMOilación en los distintos tipos tumorales y su relación con la actividad de PHD1-SUMO y PHD3-SUMO.

Inhibidores de la SUMOilación como el ácido gincólico o el ácido anacárdico que bloquean las enzimas E1 y/o E2 han mostrado su eficacia en tumores de mama en ratón (Bogachek et al., 2014; Fukuda et al., 2009; Licciardello et al., 2015). El trióxido de arsénio promueve la SUMOilación y degradación de PML y su uso está extendido en el tratamiento de la leucemia promielocítica donde induce la diferenciación celular (Hoeller y Dikic, 2009; Tatham et al., 2008). Además, varios estudios indican que la inhibición de las SENPs podría ser una terapia adecuada para combatir diversas patologías como el cáncer (Kumar y Zhang, 2015). Sin embargo, inhibidores que afectan los niveles globales de SUMOilación podrían resultar tóxicos al afectar diferentes vías de señalización. Por otra parte el tratamiento de tumores con inhibidores de PHDs puede resultar, en ocasiones, poco adecuado puesto que se promueve el crecimiento tumoral dependiente de HIF en algunos modelos clínicos (Semenza et al., 2003). Por todo ello, el mantenimiento de unos niveles adecuados de PHD1-SUMO y PHD3-SUMO podría constituir una forma de terapia alternativa para lo que se hace necesaria la profundización en el estudio de las enzimas específicas implicadas en la cascada de SUMOilación de PHD1 y PHD3.

La manipulación de la SUMOilación de PHD1 y PHD3 podría ser relevante en otras funciones fisiopatológicas. Es conocida la participación de PHD3 en el desarrollo del músculo esquelético, inflamación,

apoptosis y migración celular (Fu et al., 2007; Fu y Taubman, 2010; Kiss et al., 2012; Place et al., 2013; Su et al., 2010; Walmsley et a., 2011; Zheng et al., 2014). Por otra parte, PHD1 se ha implicado en el control del ciclo celular vía Cep192 y en la inflamación (Cummins et al., 2006; Moser et al., 2013; Tambuwala et al., 2010). Además, PHD1 y PHD3 están implicados en el desarrollo de patologías como la isquemia. En este sentido, el incremento de la SUMOilación de PHD3 podría empeorar el diagnóstico de isquemia al reprimir la activación de HIF. En cambio, niveles elevados de PHD1-SUMO podrían favorecer la adaptación metabólica y/o la producción de VEGF (dependiente de ATF4) en isquemia.

La SUMOilación afecta de manera diferencial a PHD1 y PHD3 y constituye un nivel de regulación adicional de estas proteínas. Concretamente, los resultados de este trabajo sugieren que la SUMOilación de PHD1 y PHD3 es esencial en su selectividad *vis a vis* de los diferentes sustratos analizados en la presente tesis.

VII. Conclusiones

- 1) PHD1 es diana de SUMO. En concreto, la conjugación de SUMO tiene lugar sobre los residuos K118/120 y K361. La mutación del SIM putativo no impide la SUMOilación de la proteína.
- 2) La disponibilidad de oxígeno modula la SUMOilación de PHD1; en condiciones de hipoxia (aguda y crónica), la SUMOilación de PHD1 se ve disminuida.
- 3) La SUMOilación de PHD1 es necesaria para su acumulación nuclear y regula el exporte pero no el importe de la proteína. Por el contrario, la SUMOilación de PHD1 no afecta la estabilidad de la proteína.
- 4) La SUMOilación de PHD1 no afecta su actividad frente a HIF mientras que dianas tales como ciclina-D1, ER α y ATF4 sí se ven afectadas.
- 5) PHD3 reprime la actividad transactivadora de HIF-1 por un mecanismo independiente de su actividad hidroxilasa y que implica la SUMOilación de PHD3. Sin embargo, la SUMOilación de PHD3 no regula la actividad transcripcional dependiente de HIF-2.
- 6) El efecto represor de PHD3-SUMO está mediado por el dominio de transactivación NTAD de HIF-1 α pero no por el CTAD. NTAD es, de hecho, necesario pero no suficiente como mediador de la represión.
- 7) La SUMOilación de PHD1 y PHD3 modula selectivamente el impacto de estas proteínas sobre ciertas de sus dianas.

VIII. Bibliografía

- **Acevedo, J.M., Centanin, L., Dekanty, A., Wappner, P.** (2010). Oxygen sensing in *Drosophila*: multiple isoforms of the prolyl hydroxylase fatiga have different capacity to regulate HIF α /Sima. *PLoS One*. 5: e12390.
- **Agbor, T.A., Cheong, A., Comerford, K.M., Scholz, C.C., Bruning, U., Clarke, A., Cummins, E.P., Cagney, G., Taylor, C.T.** (2011). Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1 promotes glycolysis in hypoxia. *J Biol Chem*. 286: 4718-4726.
- **Alkuraya, F.S., Saadi, I., Lund, J.J., Turbe-Doan, A., Morton, C.C., Maas, R.L.** (2006). SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. *Science*. 313: 1751.
- **Ameri, K., Lewis, C.E., Raida, M., Sowter, H., Hai, T., Harris, A.L.** (2004). Anoxic induction of ATF-4 through HIF-1-independent pathways of protein stabilization in human cancer cells. *Blood*. 103: 1876-1882.
- **Andrews, E.A., Palecek, J., Sergeant, J., Taylor, E., Lehmann, A.R., Watts, F.Z.** (2005). Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 25: 185-196.
- **Appelhoff, R.J., Tian, Y.M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Gleadle, J.M.** (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*. 279: 38458-38465.
- **Aprelikova, O., Chandramouli, G.V., Wood, M., Vasselli, J.R., Riss, J., Maranchie, J.K., Linehan, W.M., Barrett, J.C.** (2004). Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *Journal of cellular biochemistry*. 92: 491-501.
- **Aprelikova, O., Wood, M., Tackett, S., et al.** (2006). Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res*. 66: 5641-5647.
- **Aragonés, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M., Dirckx, R., Zacchigna, S., Lemieux, H., Jeoung, N.H., Lambrechts, D., Bishop, T., Lafuste, P., Diez-Juan, A., Harten, S.K., Van Note, P., De Bock, K., Willam, C., Tjwa, M., Grosfeld, A., Navet, R., Moons, L., Vandendriessche, T., Deroose, C., Wijeyekoon, B., Nuyts, J., Jordan, B., Silasi-Mansat, R., Lupu, F., Dewerchin, M., Pugh, C., Salmon, P., Mortelmans, L., Gallez, B., Gorus, F., Buyse, J., Sluse, F., Harris, R.A., Gnaiger, E., Hespel, P., Van Hecke, P., Schuit, F., Van Veldhoven, P., Ratcliffe, P., Baes, M., Maxwell, P., Carmeliet, P.** (2008). Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet*. 40: 170-180.
- **Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M.A., Bunn, H.F., Livingston, D.M.** (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 12969-12973.

- **Aravind, L., Koonin, E.V.** (2001). The DNA-repair protein AlkB, EGL-9 and Ipreca define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol.* 2: RESEARCH0007.
- **Axelrod, D., Koppel, D., Schlessinger, J., Elson, E., Webb, W.** (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal.* 16: 1055-1169.
- **Azuma, Y., Arnaoutov, A., Anan, T., Dasso, M.** (2005). PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes. *EMBO J.* 24: 2172-2182.
- **Bae, S.H., Jeong, J.W., Park, J.A., Kim, S.H., Bae, M.K., Choi, S.J., Kim, K.W.** (2004). Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications.* 324: 394-400.
- **Baek, J.H., Mahon, P.C., Oh, J., Kelly, B., Krishnamachary, B., Pearson, M., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Semenza, G.L.** (2005). OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1 α and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1 α . *Mol Cell.* 17: 503-512.
- **Bailey, D., O'Hare, P.** (2004). Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. *J Biol Chem.* 279: 692-703.
- **Barth, S., Nesper, J., Hasgall, P.A., Wirthner, R., Nytko, K.J., Edlich, F., Katschinski, D.M., Stiehl, D.P., Wenger, R.H., Camenish, G.** (2007). The peptidyl prolyl cis/trans isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability. *Mol Cell Biol.* 27: 3758-3768.
- **Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., Becker, J.** (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of molecular biology.* 280: 275-286.
- **Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J., Lima, C.D.** (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell.* 108: 345-356.
- **Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D., Pouyssegur, J.** (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *The EMBO journal.* 22: 4082-4090.
- **Berra, E., Ginouvès, A., Pouyssegur, J.** (2006). The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO reports.* 7: 41-45.
- **Berra, E., Richard, D.E., Gothie, E., Pouyssegur, J.** (2001). HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Lett.* 491: 85-90.
- **Berta, M.A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J., Brahimi-Horn, M.C.** (2007). SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 α reduces its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications.* 360: 646-652.

- **Bertout, J.A., Patel, S.A., Simon, M.C.** (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*. 8: 967-975.
- **Bhaskar, V., Valentine, S.A., Courey, A.J.** (2000). A functional interaction between dorsal and components of the Smt3 conjugation machinery. *J Biol Chem*. 275: 4033-4040.
- **Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Bell, J., Ron, D., Wouters, B.G., Koumenis, C.** (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J*. 24: 3470-3481.
- **Bishop, T., Gallagher, D., Pascual, A., Lygate, C.A., de Bono, J.P., Nicholls, L.G., Ortega-Saenz, P., Oster, H., Wijeyekoon, B., Sutherland, A.I., Grosfeld, A., Aragonés, J., Schneider, M., van Geyte, K., Teixeira, D., Diez-Juan, A., López-Barneo, J., Channon, K. M., Maxwell, P.H., Pugh, CW., Davies, AM., Carmeliet, P., Ratcliffe, P.J.** (2008). Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3^{-/-} mice. *Molecular and cellular biology*. 28: 3386-3400.
- **Blais, J.D., Filipenko, V., Bi, M., Harding, H.P., Ron, D., Koumenis, C., Wouters, B.G., Bell, J.C.** (2004). Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. *Mol Cell Biol*. 24: 7469-7482.
- **Bogachek, M.V., Chen, Y., Kulak, M.V., Woodfield, G.W., Cyr, A.R., Park, J.M., Spanheimer, P.M., Li, Y., Li, T., Weigel, R.J.** (2014). Sumoylation pathway is required to maintain the basal breast cancer subtype. *Cancer Cell*. 25: 748-761.
- **Bohren, K.M., Nadkarni, V., Song, J.H., Gabbay, K.H., Owerbach, D.** (2004). A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem*. 279: 27233-27238.
- **Bouras, T., Fu, M., Sauve, A.A., Wang, F., Quong, A.A., Perkins, N.D., Hay, R.T., Gu, W., Pestell, R.G.** (2005). SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J Biol Chem*. 280: 10264-10276.
- **Branzei, D., Sollier, J., Liberi, G., Zhao, X., Maeda, D., Seki, M., Enomoto, T., Ohta, K., Foiani, M.** (2006). Ubc9- and mms21-mediated sumoylation counteracts recombinogenic events at damaged replication forks. *Cell*. 127: 509-522.
- **Bruick, R.K., McKnight S.L.** (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 294: 1337-1340.
- **Cai, Q., 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., Robertson, E.S.** (2010). Hypoxia inactivates the VHL tumor suppressor through PIASy-mediated SUMO modification. *PLoS One*. 5: e9720.

- **Carbia-Nagashima, A., Gerez, J., Perez-Castro, C., Paez-Pereda, M., Silberstein, S., Stalla, G.K., Holsboer, F., Arzt, E.** (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during hypoxia. *Cell*. 131: 309-323.
- **Cervera, A.M., Apostolova, N., Luna-Crespo, F., Sanjuan-Pla, A., Garcia-Bou, R., McCreath, K.J.** (2006). An alternatively spliced transcript of the PHD3 gene retains prolyl hydroxylase activity. *Cancer Lett*. 233: 131-138.
- **Chang, C.C., Naik, M.T., Huang, Y.S., Jeng, J.C., Liao, P.H., Kuo, P.H., Ho, C.C., Hsieh, Y.L., Lin, C.H., Huang, N.J., Naik, N.M., Kung, C.C., Lin, S.Y., Chen, R.H., Chang, K.S., Huang, T.H., Shih, H.M.** (2011). Structural and functional roles of Daxx SIM phosphorylation in SUMOparalog-selective binding and apoptosis modulation. *Mol Cell*. 42: 62-74.
- **Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., Maity, A.** (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1: Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem*. 276: 9519-9525.
- **Chen L., Chen, J.** (2003). MDM2-ARF complex regulates p53 sumoylation. *Oncogene*. 22: 5348-5357.
- **Chen, N., Rinner, O., Czernik, D., Nytko, K.J., Zheng, D., Stiehl, D.P., Zamboni, N., Gstaiger, M., Frei, C.** (2011). The oxygen sensor PHD3 limits glycolysis under hypoxia via direct binding to pyruvate kinase. *Cell Res*. 21: 983-986.
- **Cheng, C.H., Lo, Y.H., Liang, S.S., Ti, S.C., Lin, F.M., Yeh, C.H., Huang, H.Y., Wang, T.F.** (2006a). SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 20: 2067-2081.
- **Cheng, J., Bawa, T., Lee, P., Gong, L., Yeh, E.T.** (2006b). Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia*. 8: 667-676.
- **Cheng, J., Kang, X., Zhang, S., Yeh, E.T.** (2007). SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 α during hypoxia. *Cell*. 131: 584-595.
- **Chiu, S.Y., Asai, N., Costantini, F., Hsu, W.** (2008). SUMO-specific protease 2 is essential for modulating p53-Mdm2 in development of trophoblast stem cell niches and lineages. *PLoS biology*. 6: e310.
- **Choi, S.J., Chung, S.S., Rho, E.J., Lee, H.W., Choi, M.H., Choi, H.S., Seol, J.H., Baek, S.H., Bang, O.S., Chung, C.H.** (2006). Negative modulation of RXR α transcriptional activity by small ubiquitin-related modifier (SUMO) modification and its reversal by SUMO-specific protease SUSP1. *J Biol Chem*. 281: 30669-30677.
- **Choi, Y.K., Kim, J.H., Kim, W.J., Lee, H.Y., Park, J.A., Lee, S.W., Yoon, D.K., Kim, H.H., Chung, H., Yu, Y.S., Kim, K.W.** (2007). AKAP12 regulates human blood-retinal barrier formation by downregulation of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Neurosci*. 27: 4472- 4481.

- **Choudhury, B.K., Li, S.S.** (1997). Identification and characterization of the SMT3 cDNA and gene from nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and biophysical research communications*. 234: 788-791.
- **Cimarosti, H., Ashikaga, E., Jaafari, N., Dearden, L., Rubin, P., Wilkinson, K.A. Henley, J.M.** (2012). Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32: 17-22.
- **Cimarosti, H., Lindberg, C., Bomholt, S.F., Ronn, L.C., Henley, J.M.** (2008). Increased protein SUMOylation following focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology*. 54. 280-289.
- **Cioffi, C.L., Liu, X.Q., Kosinski, P.A., Garay, M., Bowen, B.R.** (2003). Differential regulation of HIF-1 α prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 303: 947-953.
- **Comerford, K.M., Leonard, M.O., Karhausen, J., Carey, R., Colgan, S.P., Taylor, C.T.** (2003). Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 986-991.
- **Cooper, C., Liu, G.Y., Niu, Y.L., Santos, S., Murphy, L.C., Watson, P.H.** (2004). Intermittent hypoxia induces proteasome-dependent down-regulation of estrogen receptor alpha in human breast carcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 10: 8720-8727.
- **Cormac, T., McElwain, J.** (2010). Ancient Atmospheres and the Evolution of Oxygen Sensing Via The Hypoxia-Inducible Factor in Metazoans. *Physiology*. 25: 272-279.
- **Cullinan, S.B., Diehl, J.A.** (2006). Coordination of ERand oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 38: 317-332.
- **Cummins, E.P., Berra, E., Comerford, K.M., Ginouvès, A., Fitzgerald, K.T., Seeballuck, F., Godson, C., Nielsen, J.E., Moynagh, P., Pouyssegur, J., Taylor, C.T.** (2006). Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Pro Natl Acad Sci USA*. 103: 18154-18159.
- **Darby, C., Cosma, C.L., Thomas, J.H., Manoil, C.** (1999). Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Sci USA*. 96: 15202-15207.
- **Datwyler, A.L., Lattig-Tunnemann, G., Yang, W., Paschen, W., Lee, S.L., Dirnagl, U., Endres, M., Harms, C.** (2011). SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 31: 2152-2159.

- **Dayan, F., Roux, D., Brahimi-Horn, M.C., et al.** (2006). The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1 α . *Cancer Res.* 66: 3688-3698.
- **Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., Hay, R.T.** (1998). SUMO-1 modification of I κ B inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell.* 2: 233-239.
- **Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., Kemp, G.D., Hay, R.T.** (1999). Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem.* 274: 10618-10624.
- **Desterro, J.M., Thomson, J., Hay, R.T.** (1997). Ubc9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett.* 417: 297-300.
- **Di Bacco, A., Ouyang, J., Lee, H.Y., Catic, A., Ploegh, H., Gill, G.** (2006). The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Molecular and cellular biology.* 26: 4489-4498.
- **Dole, M.** (1965). The natural history of oxygen. *J Gen Physiol.* 49: 5-27.
- **Dou, H., Huang, C., Singh, M., Carpenter, P.B., Yeh, E.T.** (2010). Regulation of DNA repair through deSUMOylation and SUMOylation of replication protein A complex. *Molecular cell.* 39: 333-345.
- **Dupuy, D., Aubert, I., Dupérat, V.G., Petit, J., Taine, L., Stef, M., Bloch, B., Arveiler, B.** (2000). Mapping, Characterization, and Expression Analysis of the SM-20 Human Homologue C1orf12, and Identification of a Novel Related Gene, SCAND2. *Genomics.* 69: 348-354.
- **Durán, R.V., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Frezza, C., Heiserich, L., Tardito, S., Bussolati, O., Rocha, S., Hall, M.N., Gottlieb, E.** (2013). HIF-independent role of prolyl hydroxylases in the cellular response to amino acids. *Oncogene.* 32: 4549-4556.
- **Eladad, S., Ye, T.Z., Hu, P., Leversha, M., Beresten, S., Matunis, M.J., Ellis, N.A.** (2005). Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Human molecular genetics.* 14: 1351-1365.
- **Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., et al.** (1999). Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 18: 1905-1914.
- **Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., Fujii-Kuriyama, Y.** (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 4273-4278.
- **Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J.** (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 107: 43-54.

- **Escribese, M.M., Sierra-Filardi, E., Nieto, C., Samaniego, R., Sánchez-Torres, C., Matsuyama, T., Calderón-Gómez, E., Vega, M.A., Salas, A., Sánchez-Mateos, P., Corbí, A.L.** (2012). The Prolyl Hydroxylase PHD3 Identifies Proinflammatory Macrophages and Its Expression Is Regulated by Activin A. *J Immunol.* 2012189: 1946-1954.
- **Evdokimov, E., Sharma, P., Lockett, S.J., Lualdi, M., Kuehn, M.R.** (2008). Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3. *J Cell Sci.* 121: 4106-4113.
- **Fawcett, T.W., Martindale, J.L., Guyton, K.Z., Hai, T., Holbrook, N.J.** (1999). Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J.* 339: 135-141.
- **Ferber, E.C., Peck, B., Delpuech, O., Bell, G.P., East, P., Schulze, A.** (2012). FOXO3a regulates reactive oxygen metabolism by inhibiting mitochondrial gene expression. *Cell Death Differ.* 19: 968- 979.
- **Flotho, A., Melchior, F.** (2013). SUMOylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. *Annu Rev Biochem.* 82: 357-385.
- **Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L.** (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology.* 16: 4604-4613.
- **Foxler, D.E., Bridge, K.S., James, V., Webb, T.M., Mee, M., Wong, S.C., Feng, Y., Constantin-Teodosiu, D., Petursdottir, T.E., Bjornsson, J., Ingvarsson, S., Ratcliffe, P.J., Longmore, G.D., Sharp, T.V.** (2012). The Limd1 protein bridges an association between the Prolyl Hydroxylases and VHL to repress HIF-1 activity. *Nat Cell Biol.* 14: 201-208.
- **Fu, J.** (2016). Catalytic-independent inhibition of cIAP1-mediated RIP1 ubiquitination by EGLN3. *Cell Signal.* 28: 72-80.
- **Fu, J., Menzies, K., Freeman, R.S., Taubman, M.B.** (2007). EGLN3 prolyl hydroxylase regulates skeletal muscle differentiation and myogenin protein stability. *J Biol Chem.* 282: 12410-12418.
- **Fu, J., Taubman, M.B.** (2010). Prolyl hydroxylase EGLN3 regulates skeletal myoblast differentiation through an NF-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem.* 285: 8927-8935.
- **Fujimuro, M., Sawada, H., Yokosawa, H.** (1994). Production and characterization of monoclonal antibodies specific to multi-ubiquitin chains of polyubiquitinated proteins. *FEBS Lett.* 349: 173-180.
- **Fukuda, I., Ito, A., Hirai, G., Nishimura, S., Kawasaki, H., Saitoh, H., Kimura, K., Sodeoka, M., Yoshida, M.** (2009). Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate. *Chem Biol.* 16: 133-140.

- **Garvalov, B.K., Foss, F., Henze, A.T., Bethani, I., Gräf-Höchst, S., Singh, D., Filatova, A., Dopeso, H., Seidel, S., Damm, M., Acker- Palmer, A., Acker, T.** (2014). PHD3 regulates EGFR internalization and signaling in tumours. *Nat Commun.* 5: 5577.
- **Geiss-Friedlander, R., Melchior, F.** (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev Mol Cell Biol.* 8: 947-956.
- **Gerald, D., Berra, E., Frapart, Y.M., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Mansuy, D., Pouyssegur, J., Yaniv, M., Mechta-Grigoriou, F.** (2004). JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell.* 118: 781-794.
- **Gerber, S.A., Yatsula, B., Maier, C.L., Sadler, T.J., Whittaker, L.W., Pober, J.S.** (2009). Interferon-gamma induces prolyl hydroxylase (PHD)3 through a STAT1-dependent mechanism in human endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 29: 1363-1369.
- **Ginouvès, A., Ilc, K., Macias, N., Pouyssegur, J., Berra, E.** (2008). PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105: 4745-4750.
- **Giorgino, F., de Robertis, O., Laviola, L., Montrone, C., Perrini, S., McCowen, K.C., Smith, R.J.** (2000). The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 1125-1130.
- **Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D., Hay, R.T.** (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Molecular cell.* 11: 1043-1054.
- **Goldberg, M.A., Dunning, S.P., Bunn, H.F.** (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science.* 242: 1412-1415.
- **Golebiowski, F., Matic, I., Tatham, M.H., Cole, C., Yin, Y., Nakamura, A., Cox, J., Barton, G.J., Mann, M., Hay, R.T.** (2009). System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Science signaling.* 2: ra24.
- **Gong, L., Yeh, E.T.** (2006). Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem.* 281: 15869-15877.
- **Guo, C., Hildick, K.L., Luo, J., Dearden, L., Wilkinson, K.A., Henley, J.M.** (2013). SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. *EMBO J.* 32: 1514-1528.
- **Guo, S., Sonenshein, G.E** (2004). Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 24: 8681-8690.

- **Guyton, A.C., Manning, R.D.Jr., Norman, R.A.Jr., Montani, J.P., Lohmeier, T.E., Hall, J.E.** (1986). Current concepts and perspectives of renal volume regulation in relationship to hypertension. *J Hypertens Suppl.* 4: S49-S56.
- **Guzzo, C., Matunis, M.** (2013). Expanding SUMO and Ubiquitin-mediated signaling through hybrid SUMO-ubiquitin chains and their receptors. *Cell Cycle.* 12: 1015-1017.
- **Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R.H., Kvietikova, I., Fhitelaw, M.L., Toftgard, R., Tora, L., Gassmann, M., Poellinger, L.** (1996). Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Molecular and cellular biology.* 16: 5221-5231.
- **Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M., Ron, D.** (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 11: 619-633.
- **Hagen, T., Taylor, C.T., Lam, F., Moncada, S.** (2003). Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science.* 302: 1975-1978.
- **Hai, T., Hartman, M.G.** (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene.* 273: 1-11.
- **Hatzimichael, E., Dasoula, A., Shah, R., Syed, N., Papoudou-Bai, A., Coley, H.M., Dranitsaris, G., Bourantas, K.L., Stebbing, J., Crook, T.** (2010). The prolyl-hydroxylase EGLN3 and not EGLN1 is inactivated by methylation in plasma cell neoplasia. *European journal of haematology.* 84: 47-51
- **He, X., Riceberg, J., Pulkuri, S.M., Grossman, S., Shinde, V., Shah, P., Brownell, J.E., Dick, L., Newcomb, J., Bence, N.** (2015). Characterization of the loss of SUMO pathway function on cancer cells and tumor proliferation. *PLoS One.* 10, e0123882.
- **Hecker, C.M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., Dikic, I.** (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem.* 281: 16117-16127.
- **Hedges, S.B.** (2009). The Timetree of Life. Edited by Hedges, S.B., Kumar, S *Oxford Univ Press.* 89-98.
- **Henze, A.T., Garvalov, B.K., Seidel, S., Cuesta, A.M., Ritter, M., Filatova, A., Foss, F., Dopeso, H., Essmann, C.L., Maxwell, P.H., Reifenberger, G., Carmeliet, P., Acker-Palmer, A., Acker, T.** (2014). Loss of PHD3 allows tumours to overcome hypoxic growth inhibition and sustain proliferation through EGFR. *Nat Commun.* 5: 5582.
- **Henze, A.T., Riedel, J., Diem, T., Wenner, J., Flamme, I., Pouysegur, J., Plate, K.H., Acker, T.** (2010). Prolyl hydroxylases 2 and 3 act in gliomas as protective negative feedback regulators of hypoxia-inducible factors. *Cancer Res.* 70: 357-366.

- **Hewitson, K.S., Lienard, B.M., McDonough, M.A., Clifton, I.J., Butler, D., Soares, A.S., Oldham, N.J., McNeill, L.A., Schofield, C.J.** (2007). Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *J Biol Chem.* 282: 3293-3301.
- **Hietakangas, V., Ahlskog, J.K., Jakobsson, A.M., Hellesuo, M., Sahlberg, N.M., Holmberg, C.I., Mikhailov, A., Palvimo, J.J., Pirkkala, L., Sistonen, L.** (2003). Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol.* 23: 2953-2968.
- **Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A., Sistonen, L.** (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 45-50.
- **Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y.** (1996). cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Molecular and cellular biology.* 16: 1706-1713.
- **Hirsilä, M., Koivunen, P., Gunzler, V., Kivirikko, K.I., Myllyharju, J.** (2003). Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 278: 30772-30780.
- **Hirsilä, M., Koivunen, P., Xu, T., Seeley, K.I., Kivirikko, J., Myllyharju, J.** (2005). Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *FASEB J.* 19: 1308-1310.
- **Hiwatashi, Y., Kanno, K., Takasaki, C., Goryo, K., Sato, T., Torii, S., Sogawa, K., Yasumoto, K.** (2011). PHD1 interacts with ATF4 and negatively regulates its transcriptional activity without prolyl hydroxylation. *Exp Cell Research.* 317: 2789-2799.
- **Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., Jentsch, S.** (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature.* 419: 135-141.
- **Hoeller, D., Dikic, I.** (2009). Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature.* 458: 438-444.
- **Hofmann, W.A., Arduini, A., Nicol, S.M., Camacho, C.J., Lessard, J.L., Fuller-Pace, F.V., de Lanerolle, P.** (2009). SUMOylation of nuclear actin. *J Cell Biol.* 186: 193-200.
- **Hogan, M.R., Cockram, G.P., Lu, R.** (2006). Cooperative interaction of Zhangfei and ATF4 in transactivation of the cyclic AMP response element. *FEBS Lett.* 580: 58-62.
- **Hopfer, U., Hopfer, H., Jablonski, K., Stahl, R.A., Wolf, G.** (2006). The novel WD-repeat protein Morg1 acts as a molecular scaffold for hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 3 (PHD3). *J Biol Chem.* 281: 8645-8655.

- **Hu, C.J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H., Simon, M.C.** (2007). The N-Terminal Transactivation Domain Confers Target Gene Specificity of Hypoxia-inducible Factors HIF-1 and HIF-2. *Mol Biol Cell*. 18: 4528-4542.
- **Huang, C., Han, Y., Wang, Y., Sun, X., Yan, S., Yeh, E.T., Chen, Y., Cang, H., Li, H., Shi, G., Cheng, J., Tang, X., Yi, J.** (2009). SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *The EMBO journal*. 28: 2748-2762.
- **Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S.M., Lee, F.S.** (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem*. 277: 39792-39800.
- **Huang, K.T., Mikeska, T., Dobrovic, A., Fox, S.B.** (2010). DNA methylation analysis of the HIF-1alpha prolyl hydroxylase domain genes PHD1, PHD2, PHD3 and the factor inhibiting HIF gene FIH in invasive breast carcinomas. *Histopathology*. 57: 451-460.
- **Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., Bunn, H.F.** (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*. 271: 32253-32259.
- **Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H.F.** (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 7987-7992.
- **Huo, Z., Ye, J.C., Chen, J., Lin, X., Zhou, Z.N., Xu, X.R., Li, C.M., Qi, M., Liang, D., Liu, Y., Li, J.** (2012). Prolyl hydroxylase domain protein 2 regulates the intracellular cyclic AMP level in cardiomyocytes through its interaction with phosphodiesterase 4D. *Biochem and Bioph Res Commun*. 427: 73-79.
- **Iriondo, O., Rábano, M., Domenici, G., Carlevaris, O., López-Ruiz, J.A., Zabalza, I., Berra, E., Vivanco, M. dM.** (2015). Distinct breast cancer stem/progenitor cell populations require either HIF1 α or loss of PHD3 to expand under hypoxic conditions. *Oncotarget*. 6: 31721-31739.
- **Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Mole, D.R., Lee, S., Torres-Cabala, C., Chung, Y.L., Merino, M., Trepel, J., Zbar, B., Toro, J, Ratcliffe, P.J., Linehan, W.M., Neckers, L.** (2005). HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer cell*. 8: 143-153.
- **Ismail, I.H., Gagne, J.P., Caron, M.C., McDonald, D., Xu, Z., Masson, J.Y., Poirier, G.G., Hendzel, M.J.** (2012). CBX4-mediated SUMO modification regulates BMI1 recruitment at sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res*. 40: 5497-510.
- **Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., Kaelin, W.G.Jr.** (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*. 292: 464-468.

- **Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J.** (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 292: 468-472.
- **Jensen, K.S., Binderup, T., Jensen, K.T., Therkelsen, I., Boroup, R., Nilsson, E., Multhaupt, H., Bouchard, C., Quistorff, B., Kjaer, A., Landberg, G., Staller, P.** (2011). FOXO3a promotes metabolic adaptation to hypoxia by antagonizing Myc function. *EMBO J*. 30: 4554-4570.
- **Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R., Semenza, G.L.** (1997). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*. 272: 19253-19260.
- **Jiang, Z., Fan, Q., Zhang, Z., Zou, Y., Cai, R., Wang, Q., Zuo, Y., Cheng, J.** (2012). SENP1 deficiency promotes ER stress-induced apoptosis by increasing XBP1 SUMOylation. *Cell Cycle*. 11: 1118-1122.
- **Jin, H.O., Seo, S.K., Woo, S.H., Kim, E.S., Lee, H.C., Yoo, D.H., Choe, T.B., Hong, S.I., Kim, J.I., Park, I.C.** (2009). SP600125 negatively regulates the mammalian target of rapamycin via ATF4-induced Redd1 expression. *FEBS Lett*. 583: 123-127.
- **Johnson, E.S., Schwienhorst, I., Dohmen, R. J., Blobel, G.** (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J*. 16: 5509-5519.
- **Jokilehto, T., Högel, H., Heikkinen, P., Rantanen, K., Elenius, K., Sundström, J., Jaakkola, P.M.** (2010). Retention of prolyl hydroxylase PHD2 in the cytoplasm prevents PHD2-induced anchorage-independent carcinoma cell growth. *Exp Cell Res*. 316: 1169-1178.
- **Kagey, M.H., Melhuish, T.A., Wotton, D.** (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell*. 113: 127-137.
- **Kahyo, T., Nishida, T., Yasuda, H.** (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell*. 8: 713-718.
- **Kamitani, T., Nguyen, H.P., Kito, K., Fukuda-Kamitani, T., Yeh, E.T.** (1998). Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem*. 273: 3117-3120.
- **Kamitani, T., Nguyen, H.P., Yeh, E.T.** (1997). Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. *J Biol Chem*. 272: 14001-14004.
- **Kang, X., Li, J., Zou, Y., Yi, J., Zhang, H., Cao, M., Yeh, E.T., Cheng, J.** (2010). PIASy stimulates HIF1 α SUMOylation and negatively regulates HIF1 α activity in response to hypoxia. *Oncogene*. 29: 5568-5578.
- **Karamouzis, M.V., Konstantinopoulos, P.A., Badra, F.A., Papavassiliou, A.G.** (2008). SUMO and estrogen receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 107: 195-210.

- **Kerscher, O.** (2007). SUMO junction-what's your function? New insights through SUMOinteracting motifs. *EMBO reports*. 8: 550-555.
- **Kessler, J.D., Kahle, K.T., Sun, T., Meerbrey, K.L., Schlabach, M.R., Schmitt, E.M., Skinner, S.O., Xu, Q., Li, M.Z., Hartman, Z.C., Rao, M., Yu, P., Dominguez-Vidana, R., Liang, A.C., Solimini, N.L., Bernardi, R.J., Yu, B., Hsu, T., Golding, I., Luo, J., Osborne, C.K., Creighton, C.J., Hilsenbeck, S.G., Schiff, R., Shaw, C.A., Elledge, S.J., Westbrook, T.F.** (2012). A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis. *Science*. 335: 348-53.
- **Kikuchi, D., Minamishima, Y.A., Nakayama, K.** (2014). Prolyl-hydroxylase PHD3 interacts with pyruvate deshydrogenase (PDH)-E1 β and regulates the cellular PDH activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 451: 288-294.
- **Kim, Y.H., Dimg, K.S., Lee, S.J., Kim, Y.O., Choi, C.Y., Kim, Y.** (2005). Desumoylation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) through the cytoplasmic-nuclear shuttling SUMO-specific protease SENP1. *FEBS Lett*. 579: 6272-6278.
- **Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., Dejean, A.** (2002). The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *The EMBO journal*. 21: 2682-2691.
- **Kiss, J., Mollenhauer, M., Walmsley, S.R., Kirchberg, J., Radhakrishnan, P., Niemietz, T., Dudda, J., Steinert, G., Whyte, M.K., Carmeliet, P., Mazzone, M., Weitz, J., Schneider, M.** (2012). Loss of the oxygen sensor PHD3 enhances the innate immune response to abdominal sepsis. *J Immunol*. 189: 1955-1965.
- **Klose, R.J., Kallin, E.M., Zhang, Y.** (2006). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet*. 7: 715-727.
- **Köditz, K., Nesper, J., Wottawa, M., Stiehl, D., Camenish, G., Franke, C., Myllyharju, J., Wenger, R., Katschinski, D.M.** (2007). Oxygen dependent ATF4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor. *Blood*. 110: 3610-3617.
- **Koivunen, P., Hirsilä, M., Remes, A.M., Hassinen, I.E., Kivirikko, K.I., Myllyharju, J.** (2007). Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem*. 282: 4524-4532.
- **Kotaja, N., Karvonen, U., Jänne, O.A., Palvimo, J.J.** (2002). PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol*. 22: 5222-5234.
- **Kumar, A., Zhang, K.Y.** (2015). Advances in the development of SUMO specific protease (SENP) inhibitors. *Comput Struct Biotechnol J*. 13: 204-211.

- **Kuo, H.Y., Chang, C.C., Jeng, J.C., Hu, H.M., Lin, D.Y., Maul, G.G., Kwok, R.P., Shih, H.M.** (2005). SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 16973-16978.
- **Kyo, S., Takakura, M., Taira, T., Kanaya, T., Itoh, H., Yutsudo, M., Ariga, H., Inoue, M.** (2000). Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res*. 28: 669-677.
- **Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., Bruick, R.K.** (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 16: 1466-1471.
- **Lapenta, V., Chiurazzi, P., van der Spek, P., Pizzuti, A., Hanaoka, F., Brahe, C.** (1997). SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. *Genomics*. 40: 362-366.
- **Lassot, I., Estrabaud, E., Emiliani, S., Benkirane, M., Benarous, R., Margottin-Goguet, F.** (2005). p300 modulates ATF4 stability and transcriptional activity independently of its acetyltransferase domain. *J Biol Chem*. 280: 41537-41545.
- **Lau, K.W., Tian, Y.M., Raval, R.R., Ratcliffe, P.J., Pugh, C.W.** (2007). Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor- α in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms. *Br J Cancer*. 96: 1284-1292.
- **Lee, K.A., Lynd, J.D., O'Reilly, S., Kiupel, M., McCormick, J.J., LaPres, J.J.** (2008). The biphasic role of the hypoxia-inducible factor prolyl-4-hydroxylase, PHD2, in modulating tumor-forming potential. *Mol Cancer Res*. 6: 829-842.
- **Lee, S., Nakamura, E., Yang, H., Wei, W., Linggi, M.S., Sajan, M.P., Farese, R.V., Freeman, R.S., Carter, B.D., Kaelin, W.G.Jr., Schlisio, S.** (2005). Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer cell*. 8: 155-167.
- **Lee, Y.J., Miyake, S., Wakita, H., McMullen, D.C., Azuma, Y., Auh, S., Hallenbeck, J.M.** (2007). Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cyto-protection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 27: 950-962.
- **Leite de Oliveira, R., Deschoemaeker, S., Henze, A.T., Debackere, K., Finisguerra, V., Takeda, Y., Roncal, C., Dettori, D., Tack, E., Jonsson, Y., Veschini, L., Peeters, A., Anisimov, A., Hofmann, M., Alitalo, K., Baes, M., D'Hooge, J., Carmeliet, P., Mazzone, M.** (2012). Gene-targeting of Phd2 improves tumor response to chemotherapy and prevents side-toxicity. *Cancer cell*. 22: 263-277.
- **Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., Goldberg, M.A.** (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem*. 270: 13333-13340.

- **Li, S.J., Hochstrasser, M.** (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature*. 398: 246-251.
- **Licciardello, M.P., Müllner, M.K., Dürnberger, G., Kerzendorfer, C., Boidol, B., Trefzer, C., Sdelci, S., Berg, T., Penz, T., Schuster, M., Bock, C., Kralovics, R., Superti-Furga, G., Colinge, J., Nijman, S.M., Kubicek, S.** (2015). NOTCH1 activation in breast cancer confers sensitivity to inhibition of SUMOylation. *Oncogene*. 34: 3780-3790.
- **Lieb, M.E., Menzies, K., Moschella, M.C., Ni, R., Taubman, M.B.** (2002). Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 80: 421-426.
- **Lima, C.D., Reverter, D.** (2008). Structure of the human SENP7 catalytic domain and poly-SUMO deconjugation activities for SENP6 and SENP7. *J Biol Chem*. 283: 32045-32055.
- **Lin, D., Tatham, M.H., Yu, B., Kim, S., Hay, R.T., Chen, Y.** (2002). Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *J Biol Chem*. 277: 21740-21748.
- **Lin, X., Liang, M., Liang, Y.Y., Brunicardi, F.C., Feng, X. H.** (2003a). SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem*. 278: 31043-31048.
- **Lin, X., Liang, M., Liang, Y.Y., Brunicardi, F.C., Melchior, F., Feng, X.H.** (2003b). Activation of transforming growth factor-beta signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J Biol Chem*. 278: 18714-18719.
- **Lipscomb, E.A., Sarmiere, P.D., Crowder, R.J., Freeman, R.S.** (1999). Expression of the SM-20 gene promotes death in nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurochem*. 73: 429-432.
- **Lipscomb, E.A., Sarmiere, P.D., Freeman, R.S.** (2001). SM-20 is a novel mitochondrial protein that causes caspase-dependent cell death in nerve growth factor-dependent neurons. *J Biol Chem*. 276: 5085-5092.
- **Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., Kourembanas, S.** (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circulation research*. 77: 638-643.
- **Liu, Y., Huo, Z., Yan, B., Lin, X., Zhou, Z.N., Liang, X., Zhu, W., Liang, D., Li, L., Zhao, H., Sun, Y., Chen, Y.H.** (2010). Prolyl hydroxylase 3 interacts with Bcl-2 to regulate doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 401: 231-237.
- **Lois, L.M., Lima, C.D.** (2005). Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. *The EMBO journal*. 24: 439-451.
- **Lu, H., Forbes, R.A., Verma, A.** (2002). Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem*. 277: 23111-23115.

- **Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., Cole, R.N., Pandey, A., Semenza, G.L.** (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*. 145: 732-744.
- **Luo, W., Lin, B., Wang, Y., Zhong, J., O'Meally, R., Cole, R.N., Pandey, A., Levchenko, A., Semenza, G.L.** (2014). PHD3-mediated prolyl hydroxylation of non muscle actin impairs polymerization and cell motility. *Mol Biol Cell*. 25: 2788-2796.
- **Madden, S.L., Galella, E.A., Riley, D., Bertelsen, A.H., Beaudry, G.A.** (1996). Induction of cell growth regulatory genes by p53. *Cancer Research*. 56: 5384-5390.
- **Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., Melchior, F.** (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*. 88: 97-107.
- **Mahajan, R., Gerace, L., Melchior, F.** (1998). Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol*. 140: 259-270.
- **Mahon, P.C., Hirota, K., Semenza, G.L.** (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 15: 2675-2686.
- **Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., Poellinger, L.** (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. 414: 550-554.
- **Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.J., Tanaka, H., Poellinger, L.** (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus. *J Biol Chem*. 277: 32405-32408.
- **Manza, L.L., Codreanu, S.G., Stamer, S.L., Smith, D.L., Wells, K.S., Roberts, R.L., Liebler, D.C.** (2004). Global shifts in protein sumoylation in response to electrophile and oxidative stress. *Chemical research in toxicology*. 17: 1706-1715.
- **Martin, S., Wilkinson, K.A., Nishimune, A., Henley, J.M.** (2007). Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience*. 8: 948-959.
- **Martínez-Reyes, I., Sánchez-Aragó, M., Cuezva, J.M.** (2012). AMPK and GCN2-ATF4 signal the repression of mitochondria in colon cancer cells. *Biochem J*. 444: 249-259.
- **Masson, N., Appelhoff, R.J., Tuckerman, J.R., Tian, Y.M., Demol, H., Puype, M., Vandekerckhove, J., Ratcliffe, P.J., Pugh, C.W.** (2004). The HIF prolyl hydroxylase PHD3 is a potential substrate of theTRiC chaperonin. *FEBS Lett*. 570: 166-170.
- **Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J.** (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *The EMBO journal*. 20: 5197-5206.

- **Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I.A., van Santen, M.A., van de Rijke, F., van Dam, F., Mann, M., Vertegaal, A.C.** (2010). Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster. SUMOylation motif. *Mol Cell*. 39: 641-652.
- **Matic, I., van Hagen, M., Schimmel, J., Macek, B., Ogg, S.C., Tatham, M.H., Hay, R.T., Lamond, A.I., Mann, M., Vertegaal, A.C.** (2008). In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteomics*. 7: 132-144.
- **Matunis, M.J., Coutavas, E., Blobel, G.** (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*. 135: 1457-1470.
- **Matunis, M.J., Wu, J., Blobel, G.** (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol*. 140: 499-509.
- **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., Ratcliffe, P.J.** (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 399: 271-275.
- **Mazzone, M., Dettori, D., Leite de Oliveira, R., Loges, S., Schmidt, T., Jonckx, B., Tian, Y.M., Lanahan, A.A., Pollard, P., Ruiz de Almodóvar, C., De Smet, F., Vinckier, S., Aragonés, J., Debackere, K., Luttun, A., Wyns, S., Jordan, B., Pisacane, A., Gallez, B., Lampugnani, M.G., Dejana, E., Simons, M., Ratcliffe, P., Maxwell, P., Carmeliet, P.** (2009). Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell*. 136: 839-851.
- **McDonough, M.A., Li, V., Flashman, E., Chowdhury, R., Mohr, C., Lienard, B.M., Zondlo, J., Oldham, N.J., Clifton, I.J., Lewis, J., McNeill, L.A., Kurzeja, R.J., Hewitson, K.S., Yang, E., Jordan, S., Syed, R.S., Schofield, C.J.** (2006). Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2). *Proc Natl Acad Sci USA*. 103: 9814-9819.
- **Menzies, K., Liu, B., Kim, W.J.H., Moschella, M.C., Taubman, M.B.** (2004). Regulation of the SM-20 prolyl hydroxylase gene in smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 317: 801-810.
- **Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J.H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W.Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W., Acker, H., Fandrey, J.** (2003). Intracellular localization of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *Journal of cell science*. 116: 1319-1326.
- **Meulmeester, E., Kunze, M., Hsiao, H.H., Urlaub, H., Melchior, F.** (2008). Mechanism and consequences for paralog-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25. *Mol Cell*. 30: 610-619.

- **Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., Caput, D.** (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem.* 275: 36316-36323.
- **Miyauchi, Y., Yogosawa, S., Honda, R., Nishida, T., Yasuda, H.** (2002). Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *J Biol Chem.* 277: 50131-50136.
- **Mo, Y.Y., Yu, Y., Theodosiou, E., Ee, P.L., Beck, W.T.** (2005). A role for Ubc9 in tumorigenesis. *Oncogene.* 24: 2677-2683.
- **Mohideen, F., Capili, A.D., Bilimoria, P.M., Yamada, T., Bonni, A., Lima, C.D.** (2009). A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nature structural & molecular biology.* 16: 945-952.
- **Mole, D.R.I., Schlemminger, I., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Schofield, C.J.** (2003). 2-oxoglutarate analogue inhibitors of HIF prolyl hydroxylase. *Bioorg Med Chem Lett.* 13: 2677-2680.
- **Mooney, S.M., Grande, J.P., Salisbury, J.L., Janknecht, R.** (2010). Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential. *Biochemistry.* 49: 1-10.
- **Moschos, S.J., Jukic, D.M., Athanassiou, C., Bhargava, R., Dacic, S., Wang, X., Kuan, S.F., Fayewicz, S.L., Galambos, C., Acquafondata, M., Dhir, R., Becker, D.** (2010). Expression analysis of Ubc9, the single small ubiquitin-like modifier (SUMO) E2 conjugating enzyme, in normal and malignant tissues. *Hum Pathol.* 41: 1286-1298.
- **Moser, S.C., Bensaddek, D., Ortmann, B., Maure, J.F., Mudie, S., Blow, J., Lamond, A.I., Swedlow, J.R., Rocha, S.** (2013). PHD1 Links Cell-Cycle Progression to Oxygen Sensing through Hydroxylation of the Centrosomal Protein Cep192. *Cell.* 26: 381-392.
- **Mullen, J.R., Chen, C.F., Brill, S.J.** (2010). Wss1 is a SUMO-dependent isopeptidase that interacts genetically with the Slx5-Slx8 SUMO-targeted Ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol.* 30: 3737-3748.
- **Mukhopadhyay, D., Ayaydin, F., Kolli, N., Tan, S.H., Anan, T., Kametaka, A., Azuma, Y., Wilkinson, K.D., Dasso, M.** (2006). SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J Cell Biol.* 174: 939-949.
- **Mukhopadhyay, D., Dasso, M.** (2007). Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci.* 32: 286-295.
- **Müller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y., Dejean, A.** (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem.* 275: 13321-13329.
- **Müller, S., Matunis, M.J., Dejean, A.** (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* 17: 61-70.

- **Nacerddine, K., Lehenbre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P.P., Dejean, A.** (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9: 769-779.
- **Nakayama, K., Frew, I.J., Hagensen, M., Skals, M., Habelhah, H., Bhoumik, A., Kadoya, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Frappell, P.B., Bowtell, D.D., Ronai, Z.** (2004). Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell*. 117: 941-952.
- **Nakayama, K., Gazdoui, S., Abraham, R., Pan, Z.Q., Ronai, Z.** (2007). Hypoxia-induced assembly of prolyl hydroxylase PHD3 into complexes: implications for its activity and susceptibility for degradation by the E3 ligase Siah2. *Biochem J*. 401: 217-226.
- **Namanja, A.T., Li, Y.J., Su, Y., Wong, S., Lu, J., Colson, L.T., Wu, C., Li, S.S., Chen, Y.** (2012) Insights into High Affinity Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Recognition by SUMO-interacting Motifs (SIMs) Revealed by a Combination of NMR and Peptide Array Analysis. *J Biol Chem*. 287: 3231-3240.
- **Nandal, A., Ruiz, J.C., Subramanian, P., Ghimire-Rijal, S., Sinnamon, R.A., Stemmler, T.L., Bruick, R.K., Philpott, C.C.** (2011). Activation of the HIF prolyl hydroxylase by the iron chaperones PCBP1 and PCBP2. *Cell metabolism*. 14: 647-657.
- **Neuman, E., Ladha, M.H., Lin, N., Upton, T.M., Miller, S.J., DiRenzo, J., Pestell, R.G., Hinds, P.W., Dowdy, S.F., Brown, M., Ewen, M.E.** (1997). Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol*. 17: 5338-5347.
- **Newton, K., Matsumoto, M.L., Wertz, I.E., Kirkpatrick, D.S., Lill, J.R., Tan, J., Dugger, D., Gordon, N., Sidhu, S.S., Fellouse, F.A., Komuves, L., French, D.M., Ferrando, R.E., Lam, C., Compaan, D., Yu, C., Bosanac, I., Hymowitz, S.G., Kelley, R.F., Dixit, V.M.** (2008). Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell*. 134: 668-678.
- **Núñez-O'Mara, A., Berra, E.** (2013). Deciphering the merging role of SUMO conjugation in the hypoxia-signaling cascade. *Biol Chem*. 394: 459-469.
- **Núñez-O'Mara, A., Gerpe-Pita, A., Pozo, S., Carlevaris, O., Urzelai, B., Lopitz-Otsoa, F., Rodríguez, M.S., Berra, E.** (2015). PHD3-SUMO conjugation optimizes HIF1 repression independently of PHD3 catalytic activity. *J Cell Sci*. 128: 40-49.
- **Nytko, K.J., Maeda, N., Schläfli, P., Spielmann, P., Wenger, R.H., Stiehl, D.P.** (2011). Vitamin C is dispensable for oxygen sensing in. *Blood*. 117: 5485-5493.
- **Okuma, T., Honda, R., Ichikawa, G., Tsumagari, N., Yasuda, H.** (1999). In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochemical and biophysical research communications*. 254: 693-698.

- **Ortmann, B., Bensaddek, D., Carvalhal, S., Moser, S.C., Mudie, S., Griffis, E.R., Swedlow, J.R., Lamond, A.I., Rocha, S.** (2016). CDK-dependent phosphorylation of PHD1 on serine 130 alters its substrate preference in cells. *J Cell Sci.* 129: 191-205.
- **Oskolkova, O.V., Afonyushkin, T., Leitner, A., von Schlieffen, E., Gargalovic, P.S., Lusic, A.J., Binder, B.R., Bochkov, V.N.** (2008). ATF4-dependent transcription is a key mechanism in VEGF up-regulation by oxidized phospholipids: critical role of oxidized sn-2 residues in activation of unfolded protein response. *Blood.* 112: 330-339.
- **Owerbach, D., McKay, E.M., Yeh, E.T., Gabbay, K.H., Bohren, K.M.** (2005). A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 337: 517-520.
- **Ozer, A., Wu, L.C., Bruick, R.K.** (2005). The candidate tumor suppressor ING4 represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF). *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 7481-7486.
- **Palvimo, J.J.** (2007). PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans.* 35: 1405-1408.
- **Pan, Y., Mansfield, K.D., Bertozzi, C.C., Rudenko, V., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Simon, M.C.** (2007). Multiple factor affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol.* 27: 912-925.
- **Payne, S.J., Bowen, R.L., Jones, J.L. Wells, C.A.** (2008). Predictive markers in breast cancer-the present. *Histopathology.* 52: 82-90.
- **Pawlus, M.R., Wang, L., Murakami, A., Dai, G., Hu, C.J.** (2013). STAT3 or USF2 Contributes to HIF Target Gene Specificity. *PLoS One.*e72358.
- **Perry, J.J., Tainer, J.A., Boddy, M.N.** (2008). A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem Sci.* 33: 201-208.
- **Pescador, N., Cuevas, Y., Naranjo, S., Alcaide, M., Villar, D., Landazuri, M.O., Del Peso, L.** (2005). Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egl3/phd3) gene. *The Biochemical journal.* 390: 189-197.
- **Peurala, E., Koivunen, P., Bloigu, R., Haapasaari, K.M., Jukkola-Vuorinen, A.** (2012). Expressions of individual PHDs associate with good prognostic factors and increased proliferation in breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment.* 133: 179-188.
- **Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A., Melchior, F.** (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell.* 108: 109-120.
- **Pichler, A., Knipscheer, P., Oberhofer, E., van Dijk, W.J., Korner, R., Olsen, J.V., Jentsch, S., Melchior, F., Sixma, T.K.** (2005). SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nature structural & molecular biology.* 12: 264-269.

- **Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T.K., Melchior, F.** (2004). The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nature structural & molecular biology*. 11: 984-991.
- **Pientka, F.K., Hu, J., Schindler, S.G., Brix, B., Thiel, A., Jöhren, O., Fandrey, J., Berchner-Pfannschmidt, U., Depping, R.** (2012). Oxygen sensing by the prolyl-4-hydroxylase PHD2 within the nuclear compartment and the influence of compartmentalization on HIF-1 signalling. *J Cell Sci*. 125: 5168-5176.
- **Place, T.L., Fitzgerald, M.P., Venkataraman, S., Vorrink, S.U., Case A.J, Teoh, M.L., Domann, F.E.** (2011). Aberrant promoter CpG methylation is a mechanism for impaired PHD3 expression in a diverse set of malignant cells. *PLoS One*. 6: e14617.
- **Place, T.L., Nauseef, J.T., Peterson, M.K., Henry, M.D., Mezhir, J.J., Domann, F.E.** (2013). Prolyl-4-hydroxylase 3 (PHD3) expression is downregulated during epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One*. E83021.
- **Pollard, P.J., Loenarz, C., Mole, D.R., McDonough, M.A., Gleadle, J.M., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J.** (2008). Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *Biochem J*. 416: 387-394.
- **Potts, P.R., Yu, H.** (2005). Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Mol Cell Biol*. 25: 7021-7032.
- **Provot, S., Schipani, E.** (2007). Fetal growth plate. A developmental model of cellular adaptation to hypoxia. *Ann NY Acad Sci*. 1117: 26-39.
- **Provot, S., Zinyk, D., Gunes, Y., Kathri, R., Le, Q., Kronenberg, H. M., Johnson, R. S., Longaker, M. T., Giaccia, A. J., Schipani, E.** (2007). Hif-1 α regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development. *J Cell Biol*. 177: 451-464.
- **Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M., Ratcliffe, P.J.** (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*. 272: 11205-11214.
- **Quaegebeur, A., Segura, I., Schmieder, R., Verdegem, D., Decimo, I., Bifari, F., Dresselaers, T., Eelen, G., Ghosh, D., Davidson, S.M., Schoors, S., Broekaert, D., Cruys, B., Govaerts, K., De Legher, C., Bouché, A., Schoonjans, L., Ramer, M.S., Hung, G., Bossaert, G., Cleveland, D.W., Himmelreich, U., Voets, T., Lemmens, R., Bennett, C.F., Robberecht, W., De Bock, K., Dewerchin, M., Ghesquière, B., Fendt, S.M., Carmeliet, P.** (2016). Deletion or Inhibition of the Oxygen Sensor PHD1 Protects against Ischemic Stroke via Reprogramming of Neuronal Metabolism. *Cell Metab*. 6. S1550-4131(15)00622-1.
- **Rangasamy, D., Woytek, K., Khan, S.A., Wilson, V.G.** (2000). SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J Biol Chem*. 275: 37999-38004.

- **Rantanen, K., Pursiheimo, J.P., Högel, H., Miikkulainen, P., Sundström, J., Jaakkola, P.M.** (2013). p62/SQSTM1 regulates hypoxia response by attenuating PHD3 activity through aggregate sequestration and enhanced degradation. *J Cell Sci.* 125: 1144-1154.
- **Rawluszko, A.A., Bujnicka, K.E., Horbacka, K., Krokowicz, P., Jagodziński, P.P.** (2013). Expression and DNA methylation levels of prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, PHD3 and asparaginyl hydroxylase FIH in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 13: 526.
- **Reverter, D., Lima, C.D.** (2005). Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature.* 435: 687-692.
- **Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O.** (1992). Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science.* 256: 1193-1195.
- **Rich, P.R.** (2003). The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans.* 31: 1095-1105.
- **Ricketts, C., Foreman, J.R., Rattenberry, E., Bradshaw, N., Lalloo, F., Izatt, L., Cole, T.R., Armstrong, R., Kumar, V.K., Morrison, P.J., Atkinson, A.B., Douglas, F., Ball, S.G., Cook, J., Sirirangalingam, U., Killick, P., Kirby, G., Aylwin, S., Woodward, E.R., Evans, D.G., Hodgson, S.V., Murday, V., Chew, S.L., Connell, J.M., Blundell, T.L., Macdonald, F., Maher, E.R.** (2010). Tumor risks and genotype-phenotype-proteotype analysis in 358 patients with germline mutations in SDHB and SDHD. *Hum Mutat.* 31: 41-51.
- **Romero-Ruiz, A., Bautista, L., Navarro, V., Heras-Garvín, A., March-Díaz, R., Castellano, A., Gómez-Díaz, R., Castro, M.J., Berra, E., López-Barneo, J., Pascual, A.** (2012). Prolyl hydroxylase-dependent modulation of eukaryotic elongation factor 2 activity and protein translation under acute hypoxia. *J Biol Chem.* 287: 9651-9658.
- **Rodríguez, M.S., Dargemont, C., Hay, R.T.** (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem.* 276: 12654-12659.
- **Rosas-Acosta, G., Langereis, M.A., Deyrieux, A., Wilson, V.G.** (2005). Proteins of the PIAS family enhance the sumoylation of the papillomavirus E1 protein. *Virology.* 331: 190-203.
- **Rzymiski, T., Milani, M., Singleton, D.C., Harris, A.L.** (2009). Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. *Cell cycle.* 8: 3838-3847.
- **Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., Grosschedl, R.** (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* 15: 3088-3103.
- **Sacher, M., Pfander, B., Hoegge, C., Jentsch, S.** (2006). Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. *Nat Cell Biol.* 8: 1284-1290.

- **Saito, K., Kagawa, W., Suzuki, T., Suzuki, H., Yokoyama, S., Saitoh, H., Tashiro, S., Dohmae, N., Kurumizaka, H.** (2010). The putative nuclear localization signal of the human RAD52 protein is a potential sumoylation site. *J Biochem.* 147: 833-842.
- **Saitoh, H., Hinchey, J.** (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem.* 275: 6252-6258.
- **Saitoh, H., Pu, R., Cavenagh, M., Dasso, M.** (1997). RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1. *Proc Natl Acad Sci.* 94: 3736-3741.
- **Saitoh, H., Sparrow, D.B., Shiomi, T., Pu, R.T., Nishimoto, T., Mohun, T.J., Dasso, M.** (1998). Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Curr Biol.* 8: 121-124.
- **Salceda, S., Caro, J.** (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 272: 22642-22647.
- **Salnikow, K., Donald, S.P., Bruick, R.K., Zhitkovich, A., Phang, J.M., Kasprzak, K.S.** (2004). Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress, *J Biol Chem.* 279: 40337-40344.
- **Sampson, D.A., Wang, M., Matunis, M.J.** (2001). The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem.* 276: 21664-21669.
- **Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F., Suske, G.** (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J.* 21: 5206-5215.
- **Sato, M., Sakota, M., Nakayama, K.** (2010). Human Prp19 interacts with prolyl-hydroxylase PHD3 and inhibits cell death in hypoxia. *Exp Cell Res.* 316: 2871-2882.
- **Schlisio, S., Kenchappa, R.S., Vredeveld, L.C., George, R.E., Stewart, R., Greulich, H., Shahriari, K., Nguyen, N.V., Pigny, P., Dahia, P.L., Pomeroy, S.L., Maris, J.M., Look, A.T., Meyerson, M., Peeper, D.S., Carter, B.D., Kaelin W.G.Jr.** (2008). The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from Egln3 to induce apoptosis and is a potential p36 tumor suppressor. *Genes Dev.* 22: 884-893.
- **Schmidt, D., Müller, S.** (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 2872-2877.
- **Schulz, S., Chachami, G., Kozaczekiewicz, L., Winter, U., Stankovic-Valentin, N., Haas, P., Hofmann, K., Urlaub, H., Ovaa, H., Wittbrodt, J., Meulmeester, E., Melchior, F.** (2012). Ubiquitin-specific proteaselike 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO reports.* 13: 930-938.

- **Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., Gottlieb, E.** (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 7: 77-85.
- **Semenza, G.L.** (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 3: 721-732.
- **Semenza, G.L.** (2007). Life with oxygen. *Science*. 318: 62-64.
- **Semenza, G.L., Neufelt, M.K., Chi, S.M., Antonarakis, S.E.** (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 5680-5684.
- **Semenza, G.L., Wang, G.L.** (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 12: 5447-5454.
- **Seth, P., Krop, I., Porter, D., Polyak, K.** (2002). Novel estrogen and tamoxifen induced genes identified by SAGE (Serial Analysis of Gene Expression). *Oncogene*. 21: 836-843.
- **Shao, R., Zhang, F.P., Tian, F., Anders Friberg, P., Wang, X., Sjolund, H., Billig, H.** (2004). Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS Lett*. 569: 293-300.
- **Shen, L.N., Geoffroy, M.C., Jaffray, E.G., Hay, R.T.** (2009). Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase. *The Biochemical journal*. 421: 223-230.
- **Shin, E.J., Shin, H.M., Nam, E., Kim, W.S., Kim, J.H., Oh, B.H., Yun, Y.** (2012). DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO reports*. 13: 339-346.
- **Shipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., Johnson, R.S** (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1 alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev*. 15: 2865-2876.
- **Shipitsin, M., Campbell, L.L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Nikolskaya, T., Serebryiskaya, T., Beroukhim, R., Hu, M., Halushka, M.K., Sukumar, S., Parker, L.M., Anderson, K.S., Harris, L.N., Garber, J.E., Richardson, A.L., Schnitt, S.J., Nikolsky, Y., Gelman, R.S., Polyak, K.** (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer cell*. 11: 259-273.
- **Simoës, B.M., Piva, M., Iriondo, O., Comaills, V., Lopez-Ruiz, J.A., Zabalza, I., Mieza, J.A., Acinas, O. Vivanco, M.D.** (2011). Effects of estrogen on the proportion of stem cells in the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 129: 23-35.
- **Singleton, D.C., Harris, A.L.** (2012). Targeting the ATF4 pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 16: 1189-1202.

- **Siu, F., Bain, P.J., LeBlanc-Chaffin, R., Chen, H., Kilberg, M.S.** (2002). ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem.* 277: 24120-24127.
- **Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., Chen, Y.** (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 14373-14378.
- **Song, J., Zhang, Z., Hu, W., Chen, Y.** (2005). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation. *J Biol Chem.* 280: 40122-40129.
- **Spengler, M.L., Kurapatwinski, K., Black, A.R., Azizkhan-Clifford, J.** (2002). SUMO-1 modification of human cytomegalovirus IE1/IE72. *J Virol.* 76: 2990-2996.
- **Steinhoff, A., Pientka, F.K., Mockel, S., Kettelhake, A., Hartmann, E., Kohler, M., Depping, R.** (2009). Cellular oxygen sensing: Importins and exportins are mediators of intracellular localisation of prolyl-4-hydroxylases PHD1 and PHD2. *Biochemical and biophysical research communications.* 387: 705-711.
- **Sternsdorf, T., Jensen, K., Reich, B., Will, H.** (1999). The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem.* 274: 12555-12566.
- **Stoner, M., Saville, B., Wormke, M., Dean, D., Burghardt, R., Safe, S.** (2002). Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha in ZR-75 breast cancer cells. *Molecular endocrinology.* 16: 2231-2242.
- **Straub, J.A., Lipscomb, E.A., Yoshida, E.S., Freeman, R.S.** (2003). Induction of SM-20 in PC12 cells leads to increased cytochrome c levels, accumulation of cytochrome c in the cytosol, and caspasedependent cell death. *Journal of neurochemistry.* 85: 318-328.
- **Su, C., Huang, K., Sun, L., Yang, D., Zheng, H., Gao, C., Tong, J., Zhang, Q.** (2012). Overexpression of the HIF hydroxylase PHD3 is a favorable prognosticator for gastric cancer. *Med Oncol.* 29: 2710-2715.
- **Su, Y., Loos, M., Giese, N., Hines, O.J., Diebold, I., Görlach, A., Metzen, E., Pastorekova, S., Friess, H., Buchler, P.** (2010). PHD3 regulates differentiation, tumour growth and angiogenesis in pancreatic cancer. *British journal of cancer.* 103: 1571-1579.
- **Sundvall, M., Korhonen, A., Vaparanta, K., Anckar, J., Halkilahti, K., Salah, Z., Aqeilan, R.I., Palvimo, J.J., Sistonen, L., Elenius, K.** (2012). Protein Inhibitor of Activated STAT3 (PIAS3) Protein Promotes SUMOylation and Nuclear Sequestration of the Intracellular Domain of ErbB4 Protein. *J Biol Chem.* 287: 23216-23226.
- **Takahashi, N., Kuwaki, T., Kiyonaka, S., Numata, T., Kozai, D., Mizuno, Y., Yamamamoto, S., Naito, S., Knevels, E., Carmeliet, P., Oga, T., Kaneko, S., Suga, S., Nokami, T., Yoshida, J., Mori, Y.** (2011). TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂. *Nat Chem Biol.* 7: 701-711.

- **Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh, E.A., Yasuda, H., Kikuchi, Y.** (2001). Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem.* 276: 48973-48977.
- **Takeda, K., Fong, G.H.** (2007). Prolyl hydroxylase domain 2 protein suppresses hypoxia-induced endothelial cell proliferation. *Hypertension.* 49: 178-184.
- **Takeda, K., Ho, V.C., Takeda, H., Duan, L.J., Nagy, A., Fong, G.H.** (2006). Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Molecular and cellular biology.* 26: 8336-8346.
- **Tambuwala, M.M., Cummins, E.P., Lenihan, C.R., Kiss, J., Stauch, M., Scholz, C.C., Fraisl, P., Lasitschka, F., Mollenhauer, M., Saunders, S.P., Maxwell, P.H., Carmeliet, P., Fallon, P.G., Schneider, M., Taylor, C.T.** (2010). Loss of prolyl hydroxylase-1 protects against colitis through reduced epithelial cell apoptosis and increased barrier function. *Gastroenterology.* 139: 2093-2101.
- **Tanaka, K., Nishide, J., Okazaki, K., Kato, H., Niwa, O., Nakagawa, T., Matsuda, H., Kawamukai, M., Murakami, Y.** (1999). Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. *Mol Cell Biol.* 19:8660-8672.
- **Tang, X., Lucas, J.E., Chen, J.L., LaMonte, G., Wu, J., Wang, M.C., Koumenis, C., Chi, J.Y.** (2012). Functional interaction between responses to lactic acidosis and hypoxia regulates genomic transcriptional outputs. *Cancer Res.* 72: 491-502.
- **Tatham, M.H., Geoffroy, M.C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E.G., Palvimo, J.J., Hay, R.T.** (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol.* 10: 538-546.
- **Tatham, M.H., Jaffray, E., Song, J., Chen, Y., Hay, R.T.** (2005). Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection. *Nature Struct Mol Biol.* 12: 67-74.
- **Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H., Hay, R.T.** (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem.* 276: 35368-35374.
- **Taylor, M.S.** (2001). Characterization and comparative analysis of the EGLN gene family. *Gene.* 275: 125-132.
- **Tennant, D.A., Gottlieb, E.** (2010). HIF prolyl hydroxylase-3 mediates alpha-ketoglutarate-induced apoptosis and tumor suppression. *J Mol Med.* 88: 839-849.
- **Tian, H., McKnight, S.L., Russell, D.W.** (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 11: 72-82.

- **Tian, Y.M., Mole, D.R., Ratcliffe, P.J., Gleadle, J.M.** (2006). Characterization of different isoforms of the HIF prolyl hydroxylase PHD1 generated by alternative initiation. *Biochem J.* 397: 179-186.
- **To, K.K., Huang, L.E.** (2005). Suppression of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) transcriptional activity by the HIF prolyl hydroxylase EGLN1. *J Biol Chem.* 280: 38102-38107.
- **Tojo, M., Matsuzaki, K., Minami, T., Honda, Y., Yasuda, H., Chiba, T., Saya, H., Fujii-Kuriyama, Y., Nakao, M.** (2002). The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *J Biol Chem.* 277: 46576-46585.
- **Trent, C., Tsuing, N., Horvitz, H.R.** (1983). Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 104: 619-647.
- **Truong, K., Lee, T.D., Chen, Y.** (2012). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of E1 Cys domain inhibits E1 Cys domain enzymatic activity. *J Biol Chem.* 287: 15154-15163.
- **Truong, K., Su, Y., Song, J., Chen, Y.** (2011). Entropy Driven Mechanism of An E3 Ligase. *Biochemistry.* 50: 5757-5766.
- **Tuckerman, J.R., Zhao, Y., Hewitson, K.S., Tian, Y.M., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Mole, D.R.** (2004). Determination and comparison of specific activity of the HIFprolyl hydroxylases. *FEBS Lett.* 576: 145-150.
- **Ureña, E., Pirone, L., Chafino, S., Pérez, C., Sutherland, J.D., Lang, V., Rodriguez, M.S., Lopitz-Otsoa, F., Blanco, F.J., Barrio, R., Martín, D.** (2016). Evolution of SUMO Function and Chain Formation in Insects. *Mol Biol Evol.* 33: 568-584.
- **Valegard, K., van Scheltinga, A.C., Lloyd, M.D., Hara, T., Ramaswamy, S., Perrakis, A., Thompson, A., Lee, H.J., Baldwin, J.E., Schofield, C.J., Hajdu, J., Andersson, I.** (1998). Structure of a cephalosporin synthase. *Nature.* 394: 805-809.
- **van der Wel, H., Ercan, A., West, C.M.** (2005). The Skp1 prolyl hydroxylase from *Dictyostelium* is related to the hypoxia-inducible factor-alpha class of animal prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem.* 280: 14645-14655.
- **van Hagen, M., Overmeer, R.M., Abolvardi, S.S., Vertegaal, A.C.** (2010). RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2alpha. *Nucleic Acids Res.* 38: 1922-1931.
- **Vlachostergios, P.J., Papandreou, C.N.** (2012). The Role of the Small Ubiquitin-Related Modifier (SUMO) Pathway in Prostate Cancer. *Biomolecules.* 2: 240-255.
- **Walmsley, S.R., Chilvers, E.R., Thompson, A.A., Vaughan, K., Marriott, H.M., Parker, L.C., Shaw, G., Parmar, S., Schneider, M., Sabroe, I., Dockrell, D.H., Milo, M., Taylor, C.T., Johnson, R.S., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Maxwell, P.H., Carmeliet, P., Whyte, M.K.** (2011). Prolyl hydroxylase 3 (PHD3) is

essential for hypoxic regulation of neutrophilic inflammation in humans and mice. *The Journal of clinical investigation*. 121: 1053-1063.

- **Wang, C., Tao, W., Ni, S., Chen, Q., Zhao, Z., Ma, L., Fu, Y., Jiao, Z.** (2015). Tumor-suppressive microRNA-145 induces growth arrest by targeting SENP1 in human prostate cancer cells. *Cancer Sci*. 106: 375-382.
- **Wang, F., Gao, J.X., Mimura, J., Kobayashi, A., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y.** (1998). Structure and expression of the mouse AhR nuclear translocator (mArnt) gene. *J Biol Chem*. 273: 24867-24873.
- **Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L.** (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop/helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 5510-5514.
- **Wang, K., Zhang, X.C.** (2014). Inhibition of SENP5 sup-presses cell growth and promotes apoptosis in osteosarcoma cells. *Exp Ther Med*. 7: 1691-1695.
- **Wang, L., Banerjee, S.** (2004). Differential PIAS3 expression in human malignancy. *Oncology reports*. 11: 1319-1324.
- **Wang, Y., Alam, G.N., Ning, Y., Visioli, F., Dong, Z., Nör, J.E., Poverini, P.J.** (2012). The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway. *Cancer Res*. 72: 5396-53406.
- **Wang, Y., Ning, Y., Alam, G.N., Jankowski, B.M., Dong, Z., Nör, J.E., Poverini, P.J.** (2013). Amino acid deprivation promotes tumor angiogenesis through the GCN2/ATF4 pathway. *Neoplasia*. 15: 989-997.
- **Wang, Z., Wang, R., Sheng, H., Sheng, S.P., Paschen, W., Yang, W.** (2012). Transient ischemia induces massive nuclear accumulation of SUMO2/3-conjugated proteins in spinal cord neurons. *Spinal Cord*. 51: 139-143.
- **Warnecke, C., Griethe, W., Weidemann, A., Jürgensen, J.S., Willam, C., Bachmann, S., Ivashchenko, Y., Wagner, I., Frei, U., Wiesener, M., Eckardt, K.U.** (2003). Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors. *FASEB J*. 17: 1186-1188.
- **Warshakoon, N.C.S., Wu, S., Boyer, A., Kawamoto, R., Renock, S., Xu, K., Pokross, M., Evdomikov, A.G., Zhou, S., Winter, C., Walter, R., Mekel, M.** (2006). Design and synthesis of substituted pyridine derivatives as HIF-1alpha prolyl hydroxylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 16: 5616-5620.
- **Wax, S.D., Rosenfield, C.L., Taubman, M.B.** (1994). Identification of a novel growth factor-responsive gene in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 269: 13041-13047.
- **Weger, S., Hammer, E., Heilbronn, R.** (2005). Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett*. 579: 5007-5012.
- **Wenger, R.H., Stiehl, D.P., Camenisch, G.** (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*. re12.

- **Willam, C., Maxwell, P.H., Nichols, L., Lygate, C., Tian, Y.M., Bernhardt, W., Wiesener, M., Ratcliffe, P.J., Eckardt, K.U., Pugh, C.W.** (2006). HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 41: 68-77.
- **Whitney, M.L., Jefferson, L.S., Kimball, S.R.** (2009). ATF4 is necessary and sufficient for ER stress-induced upregulation of REDD1 expression. *Biochem Biophys Res*. 379: 451-455.
- **Wolff, B., Sanglier, J.J., Wang, Y.** (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol*. 4: 139-147.
- **Wong, K.H., Todd, R.B., Oakley, B.R., Oakley, C.E., Hynes, M.J., Davis, M.A.** (2008). Sumoylation in *Aspergillus nidulans*: *sumO* inactivation, overexpression and live-cell imaging. *Fungal Genet Biol*. 45: 728-737.
- **Wottawa, M., Köditz, J., Katschinski, D.M.** (2010). Normoxic destabilization of ATF-4 depends on proteasomal degradation. *Acta Physiologica*. 198: 457-463.
- **Wu, C., Rankin, E.B., Castellini, L., Alcludia, J.F., LaGory, E.L., Andersen, R., Rhodes, S.D., Wilson, T.L., Mohammad, K.S., Castillo, A.B., Guise, T.A., Schipani, E., Giaccia, A.J.** (2015). Oxygen-sensing PHDs regulate bone homeostasis through the modulation of osteoprotegerin. *Genes Dev*. 29: 817-831.
- **Xiao, G., Jiang, D., Ge, C., Zhao, Z., Lai, Y., Boules, H., Phimphilai, M., Yang, X., Karsenty, G., Franceschi, R.T.** (2005). Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem*. 280: 30689-30696.
- **Xie, L., Pi, X., Mischra, A., Fong, G., Peng, J., Patterson, C.** (2012). PHD3-dependent hydroxylation of HCLK2 promotes the DNA damage response. *J Clin Invest*. 122: 2827-2836.
- **Xie, L., Pi, X., Townley-Tilson, W.H., Li, N., Wehrens, X.H., Entman, M.L., Taffet, G.E., Mishra, A., Peng, J., Schisler, J.C., Meissner, G., Patterson, C.** (2015a). PHD2/3-dependent hydroxylation tunes cardiac response to β -adrenergic stress via phospholamban. *J Clin Invest*. 125: 2759-2771.
- **Xie, L., Pi, X., Wang, Z., He, J., Willis, M.S., Patterson, C.** (2015b). Depletion of PHD3 protects heart from ischemia/reperfusion injury by inhibiting cardiomyocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol*. 80: 156-165.
- **Xie, L., Xiao, K., Whalen, E.J., Forrester, M.T., Freeman, R.S., Fong, G., Gygi, S.P., Lefkowitz, R.J., Stamler, J.S.** (2009) Oxygen-regulated beta(2)-adrenergic receptor hydroxylation by EGLN3 and ubiquitylation by pVHL. *Science signaling*. 2: ra33.
- **Xu, Y., Zuo, Y., Zhang, H., Kang, X., Yue, F., Yi, Z., Liu, M., Yeh, E.T., Chen, G., Cheng, J.** (2010). Induction of SENP1 in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis. *J Biol Chem*. 285: 36682-36688.

- **Xue, J., Li, X., Jiao, S., Wei, Y., Wu, G., Fang, J.** (2010). Prolyl hydroxylase-3 is down-regulated in colorectal cancer cells and inhibits IKKbeta independent of hydroxylase activity. *Gastroenterology*. 138: 606-615.
- **Yan, B., Jiao, S., Zhang, H.S., Lv, D.D., Xue, J., Fan, L., Wu, G.H., Fang, J.** (2011). Prolyl hydroxylase domain protein 3 targets Pax2 for destruction. *Biochem Biophys Res Commun*. 409: 315-320.
- **Yang, S.H., Galanis, A., Witty, J., Sharrocks, A.D.** (2006). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J*. 25: 5083-5093.
- **Yang, S.H., Sharrocks, A.D.** (2009). The SUMO E3 ligase activity of Pc2 is coordinated through a SUMO interaction motif. *Mol Cell Biol*. 30: 2193-2205.
- **Yang, W., Sheng, H., Warner, D.S., Paschen, W.** (2008a). Transient focal cerebral ischemia induces a dramatic activation of small ubiquitin-like modifier conjugation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 28: 892-896.
- **Yang, X.J., Gregoire, S.** (2006). A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond. *Mol Cell*. 23: 779-786.
- **Yasumoto, K., Kowata, Y., Yoshida, A., Torii, S., Sogawa, K.** (2009). Role of the intracellular localization of HIF-prolyl hydroxylases. *Biochim Biophys Acta*. 1793: 792-797.
- **Yu, V.W., Ambartsoumian, G., Verlinden, L., Moir, J.M., Prud'homme, J., Gauthier, C., Roughley, P.J., St-Arnaud, R.** (2005). FIAT represses ATF4-mediated transcription to regulate bone mass in transgenic mice. *J Cell Biol*. 169: 591-601.
- **Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., Millhorn, D.E.** (2003). Cobalt inhibits the interaction between hypoxia inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia inducible factor- α . *J Biol Chem*. 278: 15911-15916.
- **Yunus, A.A., Lima, C.D.** (2009). Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Mol Cell*. 35: 669-82.
- **Yurchenko, V., Xue, Z., Sadofsky, M.J.** (2006). SUMO modification of human XRCC4 regulates its localization and function in DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology*. 26: 1786-1794.
- **Zhang, F.P., Mikkonen, L., Toppari, J., Palvimo, J.J., Thesleff, I., Janne, O.A.** (2008). Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol Cell Biol*. 28: 5381-5390.
- **Zhang, H.S., Yan, B., Li, X.B., Fan, L., Zhang, Y.F., Wu, G.H., Li, M., Fang, J.** (2012). PAX2 protein induces expression of cyclin D1 through activating AP-1 protein and promotes proliferation of colon cancer cells. *J Biol Chem*. 287: 44164-44172.

- Zhang, J., Wang, C., Chen, X., Takada, M., Fan, C., Zheng, X., Wen, H., Liu, Y., Wang, C., Pestell, R.G., Aird, K.M., Kaelin, W.G.Jr., Liu, X.S., Zhang, Q. (2015). EglN2 associates with the NRF1-PGC1 α complex and controls mitochondrial function in breast cancer. *EMBO J.* 34: 2953-2970.
- Zhang, Q., Gu, J., Li, L., Liu, J., Luo, B., Cheung, H.W., Boehm, J.S., Ni, M., Geisen, C., Root, D.E., Polyak, K., Brown, M., Richardson, A.L., Hahn, W.C., Kaelin, W.G.Jr., Bommi-Reddy, A. (2009). Control of cyclin D1 and breast tumorigenesis by the EglN2 prolyl hydroxylase. *Cancer cell.* 16: 413-424.
- Zhang, Z., Ren, J.S., Harlos, K., McKinnon, C.H., Clifton, I.J., Schofield, C.J. (2002). Crystal structure of a clavamate synthase-Fe(II)-2-oxoglutarate-substrate-NO complex: evidence for metal centred rearrangements. *FEBS Lett.* 517: 7-12.
- Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., Zhao, M.Y., Xue, Y., Ren, J. (2014). GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Research.* 42: W325-W330.
- Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zha, Z., Wang, P., Yu, W., Li, Z., Gong, L., Peng, Y., Ding, J., Lei, O., Guan, K.L., Xion, Y. (2009). Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science.* 324: 261-265.
- Zhao, X., Blobel, G. (2005). A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 4777-4782.
- Zheng, X., Zhai, B., Koivunen, P., Shin, S.J., Lu, G., Liu, J., Geisen, C., Chakraborty, A.A., Moslehi, D.J., Smalley, D.M., Wei, X., Chen, X., Chen, Z., Beres, J.M., Zhang, K., Tsao, J.L., Brenner, M.C., Zhang, Y., Fan, C., DePinho, R.A., Paik, J., Gygi, S.P., Kaelin, W.G.Jr., Zhang, Q. (2014). Prolyl hydroxylation by EglN2 destabilizes FOXO3a by blocking its interaction with the USP9x deubiquitinase. *Genes Dev.* 28: 1429-1444.
- Zhou, X., Wang, R., Fan, L., Li, Y., Ma, L., Yang, Z., Yu, W., Jing, N., Zhu, X. (2005). Mitosin/CENP-F as a negative regulator of activating transcription factor-4. *J Biol Chem.* 280: 13973-1397.
- Zhu, J., Zhu, S., Guzzo, C.M., Ellis, N.A., Sung, K.S., Choi, C.Y., Matunis, M.J. (2008). Small ubiquitin-related modifier (SUMO) binding determines substrate recognition and paralog-selective SUMO modification. *J Biol Chem.* 283: 29405-29415.
- Zhu, K., Jiao, H., Li, S., Cao, H., Galson, D.L., Zhao, Z., Zhao, X., Lai, Y., Fan, J., Im, H.J., Chen, D., Xiao, G. (2013). ATF4 promotes bone angiogenesis by increasing VEGF expression and release in the bone environment. *J Bone Miner Res.* 28: 1870-1884.
- Zhu, S., Sachdeva, M., Wu, F., Lu, Z., Mo, Y.Y. (2010). Ubc9 promotes breast cell invasion and metastasis in a sumoylation-independent manner. *Oncogene.* 29: 1763-1772.

- **Zwijzen, R.M., Wientjens, E., Klompaker, R., van der Sman, J., Bernards, R., Michalides, R.J. (1997).** CDK independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell*. 88: 405-415.

IX. Anexo

Manuscrito 1

Núñez-O'Mara, A., **Gerpe-Pita, A.**, Pozo, S., Carlevaris, O., Urzelai, B., Lopitz-Otsoa, F., Rodríguez, M., Berra, E. (2015). PHD3-SUMO conjugation represses HIF1 transcriptional activity independently of PHD3 catalytic activity. *Journal of Cell Science*.128: 40-49

RESEARCH ARTICLE

PHD3–SUMO conjugation represses HIF1 transcriptional activity independently of PHD3 catalytic activity

Analía Núñez-O'Mara, Almudena Gerpe-Pita, Sara Pozo, Onintza Carlevaris, Bakarne Urzelai, Fernando Lopitz-Otsoa, Manuel S. Rodríguez and Edurne Berra*

ABSTRACT

By controlling HIF α hydroxylation and stability, the prolyl hydroxylase domain (PHD)-containing proteins are essential to the maintenance of oxygen homeostasis; therefore these enzymes are tightly regulated. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) is a 10-kDa protein readily conjugated to lysine residues of the targeted proteins in a process termed SUMOylation. In this study, we introduce SUMO conjugation as a novel regulator of PHD3 (also known as EGLN3). PHD3 SUMOylation occurs at a cluster of four lysines at the C-terminal end of the protein. Furthermore, PHD3 SUMOylation by SUMO2 or SUMO3 contributes to PHD3-mediated repression of HIF1-dependent transcriptional activity. Interestingly, PHD3–SUMO conjugation does not affect PHD3 hydroxylase activity or HIF1 α stability, providing new evidence for a dual role of PHD3 in HIF1 regulation. Moreover, we show that hypoxia modulates PHD3–SUMO conjugation and that this modification inversely correlates with HIF1 activation. PHD3 SUMOylation highlights a new and additional layer of regulation that is likely required to fine-tune HIF function.

KEY WORDS: HIF α , Hypoxia, PHD, EGLN, SUMO, Transcriptional repression

INTRODUCTION

Maintaining oxygen homeostasis is essential for most organisms as hypoxia, even when transient, could trigger irreversible damage. Adaptation to reduced oxygen availability is indeed a major physiological challenge during embryonic development and in adulthood, but it is also associated with many human diseases (Benizri et al., 2008). This adaptation is primarily led by activation of hypoxia inducible factor (HIF), which controls the expression of hundreds of direct target genes, secondary transcription factors and non-coding RNAs (Semenza, 2012). HIF is a heterodimer formed by the interaction of the constitutive HIF β subunit with a tightly regulated HIF α subunit (Huang et al., 1996; Salceda and Caro, 1997; Wang et al., 1995). Oxygen-dependent hydroxylation by the prolyl hydroxylase domain (PHD)-containing proteins drives HIF α ubiquitylation and proteasomal degradation (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Hydroxylation is indeed limiting for HIF α degradation and hence HIF activation.

Caenorhabditis elegans and *Drosophila melanogaster* have a single PHD family member (EGL-9), whereas the genomes of higher metazoans encode at least three paralogous PHD proteins (PHD1, PHD2 and PHD3; also known as EGLN2, EGLN1 and EGLN3, respectively) (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001). All three PHD proteins catalyze site-specific hydroxylation of HIF1 α polypeptides at P564 *in vitro*. However, PHD2 appears to be primarily responsible for basal HIF α levels, although PHD1 and PHD3 contribute to HIF α regulation in certain settings (Berra et al., 2003; Ginouvès et al., 2008; Takeda et al., 2006). Thereby, we found previously that PHD3, through isoform-specific regulatory mechanisms, participates in a negative-feedback loop in response to prolonged hypoxia (Ginouvès et al., 2008). Moreover, recent reports highlight specific HIF-independent targets for PHDs. In this regard, PHD1 controls cyclin D1 levels and thus mammary gland proliferation (Zhang et al., 2009). PHD2 has been found to modulate protein translation through regulation of eEF2 phosphorylation (Romero-Ruiz et al., 2012). PHD3 mediates oxygen-dependent stability of activating transcription factor 4 (ATF4), PKM2 and β_2 -adrenergic receptor, and prevents degradation of myogenin (Fu et al., 2007; Köditz et al., 2007; Luo et al., 2011; Xie et al., 2009). PHD3 also negatively regulates NF- κ B and Pax2 (Fu and Taubman, 2010; Xue et al., 2010; Yan et al., 2011). Furthermore, PHD3 appears to be necessary and sufficient for apoptosis of neuronal cells after nerve growth factor withdrawal (Lee et al., 2005). The absence of PHD3 is indeed related to the failure of developmental apoptosis, which might play a role in pheochromocytoma pathogenesis. Clearly if the PHD proteins are to be targeted, it will be important to understand the basis of their specificities.

Post-translational modifications (PTMs) act to fine-tune the functions of encoded proteins, and they play a crucial role in conferring plasticity. Among several PTMs, SUMOylation, the conjugation of the small ubiquitin-related modifier (SUMO) to target proteins, has emerged as a fundamental strategy to modulate protein function (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). SUMOylation requires a sequential enzymatic cascade implicating SUMO-specific E1 and E2 enzymes and, for some substrates, a SUMO-E3 ligase. As is the case for many other PTMs, SUMOylation is a reversible process, with SUMO proteases acting to remove the modification (Hay, 2007). SUMOylation occurs often, but not exclusively, at the lysine residue within the consensus SUMO-acceptor site sequence ψ KxE/D, in which ψ is an aliphatic branched amino acid (Rodríguez et al., 2001). Altered patterns of protein SUMOylation are associated with stress, suggesting that SUMO modification is essential in the cellular adaptation to environmental changes (Tempé et al., 2008). Accordingly, previous reports have provided insight into the direct implications of SUMO conjugation on the regulation of

Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias-CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia, Ed. 801A, 48190 Derio, Spain.

*Author for correspondence (eberra@cicbiogune.es)

Received 12 February 2014; Accepted 30 October 2014

essential factors required for hypoxia adaptation, such as HIF α , HIF β , VHL and p300 (Núñez-O'Mara and Berra, 2013).

To gain further insight into PHD3 regulation, we evaluated whether SUMO conjugates to PHD3. In the present study, we show for the first time that PHD3 can be a SUMO target. Surprisingly, our results demonstrate that PHD3 SUMOylation represses HIF1 transactivation activity without affecting HIF1 α stability. Moreover, we present evidence that hypoxia modulates PHD3 SUMOylation and that this modification correlates with the inhibition of HIF1. PHD3 SUMOylation appears to be a newly identified additional step in the control of HIF.

RESULTS

PHD3 can be SUMOylated

To study new mechanisms of PHD3 regulation, we evaluated whether PHD3 can be modified by SUMO. We incubated [³⁵S]-methionine-labeled HA-PHD3 that had been *in vitro* transcribed and translated (IVTT) with a SUMOylation mixture, including the E1 (SAE1 and SAE2) and E2 (UBC9) enzymes, in the absence or

in the presence of SUMO or GST-SUMO. As shown in Fig. 1A, we detected the non-modified PHD3 as well as higher-molecular-mass bands in the presence of SUMO1, 2 and 3 or GST-SUMO1, 2 and 3, suggesting that PHD3 is a target for SUMO. The identity of the high-molecular-mass band was revealed by double immunoblotting with anti-HA and anti-SUMO (Fig. 1B), which confirmed the presence of PHD3-SUMO conjugates.

Among SUMO proteins, SUMO1 shares only 50% identity with SUMO2 and SUMO3, which are almost identical (Su and Li, 2002). Hereafter, we use the nomenclature SUMO2/3 to refer to both proteins, as the two paralogs cannot be functionally distinguished. In view of the *in vitro* results, we next transfected (His)₆-tagged PHD3 together with HA-SUMO1 or HA-SUMO2/3 into COS-7 cells. PHD3 was purified under denaturing conditions on Ni-NTA beads, and the purified material was analyzed by western blotting (Fig. 1C). In the presence of SUMO2/3, we were able to detect high-molecular-mass PHD3 bands with the anti-(His)₆ antibody. The anti-HA antibody also recognized these bands, confirming that they corresponded to

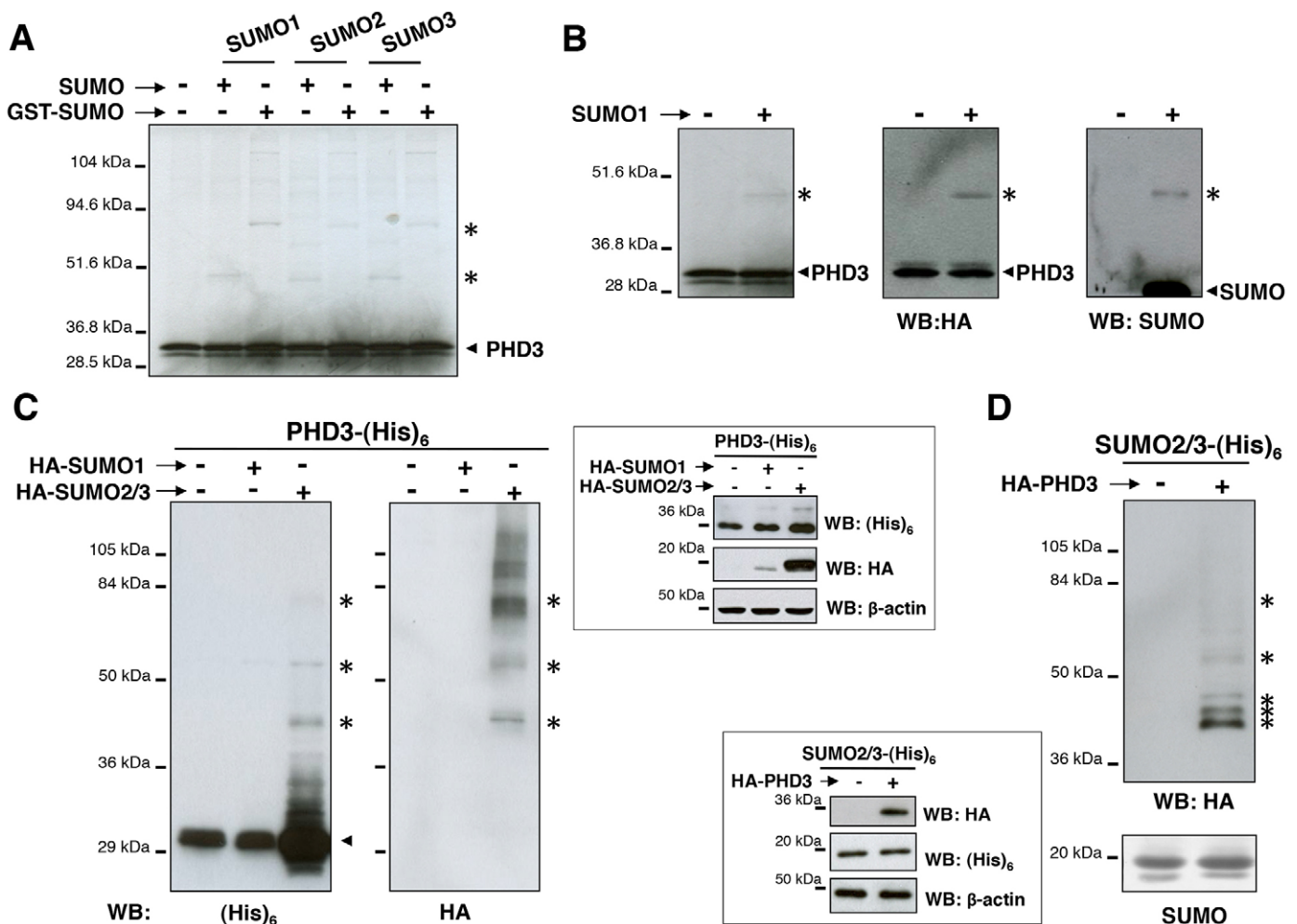


Fig. 1. PHD3 is a SUMO target. (A) [³⁵S]-labeled IVTT PHD3 was incubated in the presence of the SUMOylation reaction buffer and the indicated SUMO proteins, resolved by SDS-PAGE and detected by autoradiography. The arrowhead and asterisks correspond to the non-modified and the conjugated forms of PHD3, respectively. (B) The PHD3 forms detected by autoradiography (left panel) were identified by western blotting (WB; central and right panel). Note that the left panel shows the first two lanes of the autoradiogram presented in A, for comparison with the western blotting data. COS7 (C) and HEK293T (D) cells were transfected as indicated. Ni-NTA affinity purification was performed after 48 h, and the purified proteins were resolved by SDS-PAGE and finally visualized by using western blotting. Insets show the protein expression levels from total cell extracts transfected in parallel. β -actin was used as the protein loading control.

PHD3–SUMO conjugates. Note that SUMO2/3 was expressed at higher levels compared with SUMO1 (inset Fig. 1C), which might explain the absence of PHD3–SUMO1 conjugates (Fig. 1C). To validate the identification of PHD3 as a new SUMO target protein, we performed the reciprocal purification (Fig. 1D). We could show that PHD3 does co-purify with (His)₆-tagged SUMO2/3 when both proteins were ectopically expressed. Taken together, these data confirm that PHD3 can be a SUMO target protein not only *in vitro* but also in cultured cell lines.

Looking for the PHD3 SUMOylation motif(s)

Although PHD3 lacks any consensus SUMO acceptor site, an analysis of the sequence showed 12 evolutionary conserved lysines that might be potential SUMO-modified residues. To facilitate the identification of the target residue(s), we generated two overlapping truncated forms of PHD3 (PHD3 Nter and PHD3 Cter) that were subjected to *in vitro* SUMOylation assays as described previously. Interestingly, PHD3 Nter was no longer SUMOylated, whereas PHD3 Cter was still modified like the wild-type protein (Fig. 2A), suggesting that PHD3 is SUMOylated at the C-terminal region of the protein. We replaced each of the putative SUMO target lysines located within PHD3 Cter (K119, K154, K159, K172, K222, K223, K224 and K231) with arginines (R). However, none of the individual mutations prevented PHD3

SUMOylation (supplementary material Fig. S1). We next adopted a three-dimensional homology approach using an online server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) to better characterize the SUMO-modified residues (Kelley and Sternberg, 2009). This approach allowed us to identify two clusters of lysines at the C-terminal region of PHD3. These clusters correspond to lysines 154, 159 and 172 and lysines 222, 223, 224 and 231, respectively. Mutation of the two different clusters independently allowed us to identify lysines 222, 223, 224 and 231 as the PHD3 SUMOylation motif, at least *in vitro* (Fig. 2B).

To confirm these results, we transfected HEK293T cells with (His)₆-tagged SUMO2/3 together with wild-type PHD3 or PHD3 K222/223/224/231R. Consistent with the *in vitro* assays, PHD3 SUMOylation was almost abolished in the K222/223/224/231R mutant compared with that of the wild-type protein (Fig. 2C). Thus, we confirmed the PHD3 SUMOylation motif and accordingly identified the SUMOylation dead mutant (K222/223/224/231R), which we will refer to hereafter as PHD3 Δ SUMO.

PHD3 SUMOylation affects HIF activity but does not affect the NF- κ B pathway

Although it was originally identified as a repressor of the HIF complex, additional roles have been reported for PHD3. We wondered whether SUMOylation might affect specific PHD3

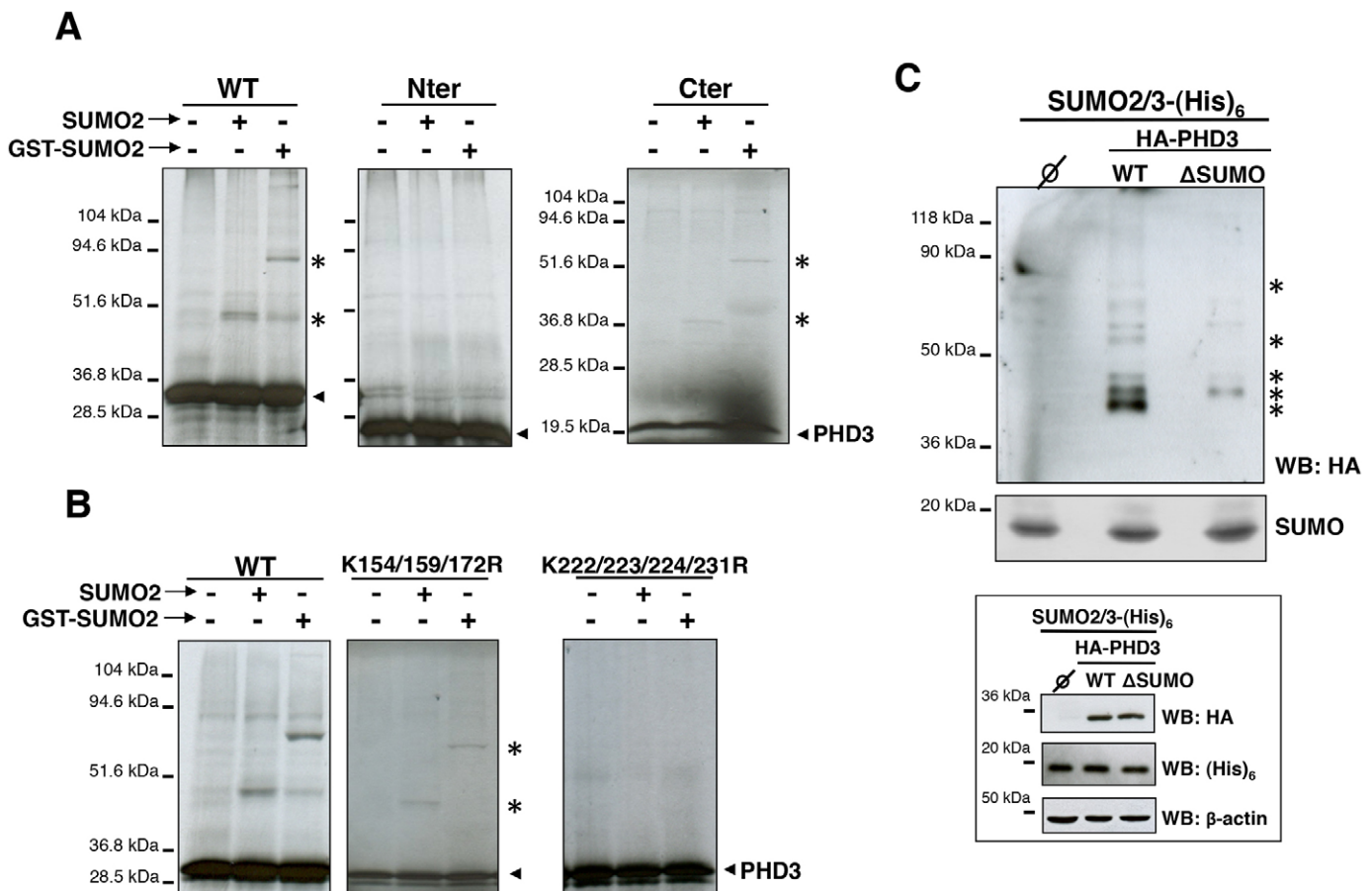


Fig. 2. Identification of the PHD3 SUMOylation site(s). (A) The wild type (WT) and truncated (Nter and Cter) [³⁵S]-labeled IVTT PHD3 constructs were incubated as described for Fig. 1A. The non-modified (arrowhead) and the modified (asterisk) forms of PHD3 were detected by autoradiography. (B) The indicated PHD3 constructs were subjected to an *in vitro* SUMOylation as described for Fig. 1A. (C) HEK293T cells were transfected as indicated, the SUMO-conjugated proteins were purified on Ni-NTA beads, resolved by SDS-PAGE and finally visualized by using western blotting (WB). The inset shows the protein expression levels from total cell extracts transfected in parallel. β-actin was used as the protein loading control. ∅, empty vector.

functions. We initially focused on two signaling pathways, the HIF and NF- κ B pathways, as they implicate PHD3 hydroxylase activity-dependent and -independent mechanisms, respectively. To address this issue, we co-transfected HEK293T cells with the different PHD3 mutants and luciferase reporter plasmids under the control of HIF- or NF- κ B-responsive elements (HRE-Luc or NF- κ B-Luc, respectively). In addition to PHD3 Δ SUMO, we generated chimeric PHD3 mutants (PHD3-SUMO1 and PHD3-SUMO2/3) by fusing SUMO1 or SUMO2/3 to the C-terminal end of PHD3 (Fig. 3; supplementary material Fig. S2). This strategy has been successfully used to mimic constitutive SUMOylation and study the impact of SUMOylation on target proteins (Ross et al., 2002). Note that the two glycine residues, which are crucial for generating the covalent link between SUMO and the target proteins were removed in the chimera to exclude the possibility of the fusion protein acting as a SUMO-like protein.

Luciferase activity following the expression of wild-type PHD3 and H196A (the hydroxylase dead mutant) was consistent with the predicted impact of these proteins on hypoxia-induced HIF activation (Fig. 3A). PHD3-SUMO2/3 was a significantly stronger HIF repressor compared with wild-type PHD3, whereas PHD3 Δ SUMO showed a clear tendency to be a less active repressor (Fig. 3A). This tendency is overcome by fusing SUMO2/3 to PHD3 Δ SUMO, supporting the role of SUMO conjugation in PHD3-mediated HIF repression (Fig. 3A). Moreover, the effect of the SUMO2/3 chimera was specific, as PHD3-SUMO1 behaved similarly to the wild-type protein (supplementary material Fig. S2). In contrast to the effects on

the HIF pathway, all of the PHD3 mutants inhibited TNF α -triggered activation of NF- κ B in a similar manner. Therefore, our data imply that PHD3 SUMOylation optimizes its HIF repressor activity without affecting the NF- κ B pathway (Fig. 3B).

To test whether endogenous SUMOylation at physiological levels contributes to HIF repression, HEK293T cells were transfected with short hairpin (sh)RNAs targeting HIF1 α (used as an internal control), UBC9 or SUMO3 and the luciferase reporter plasmids. According to our data, UBC9 or SUMO3 silencing, and therefore the inhibition of the SUMOylation machinery, increased hypoxia-triggered HIF activation (supplementary material Fig. S2).

Impact of PHD3 SUMOylation on protein stability and localization

Although the functional consequences of SUMOylation depend on the modified protein, SUMO conjugation is very often associated with temporal and spatial regulation of its targets. Therefore, to evaluate the impact of SUMO conjugation on PHD3 behavior, we analyzed the stability of PHD3 and PHD3-SUMO conjugates. We co-transfected PHD3 and (His)₆-tagged SUMO2/3 plasmids. After transfection, we treated cells with the protein synthesis inhibitor cycloheximide and harvested cells at the indicated times (Fig. 4A). SUMOylated proteins were recovered on Ni-NTA beads, and PHD3-SUMO conjugates were identified by immunoblotting (Fig. 4A, left panel). In parallel, the expression of the non-modified PHD3 was resolved using total

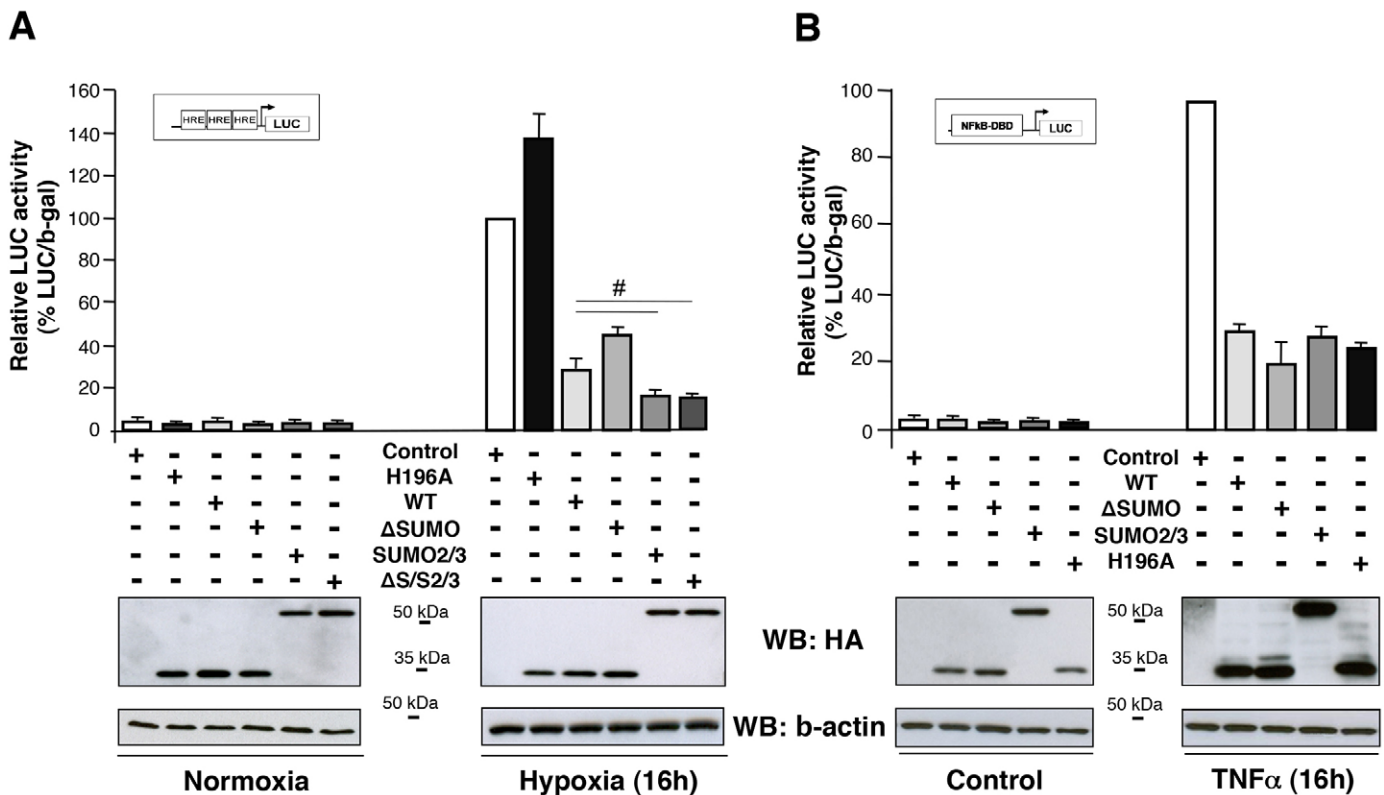


Fig. 3. The impact of SUMOylation on PHD3-dependent regulation of the HIF and NF- κ B pathways. (A) The indicated PHD3 constructs were transfected into HEK293T cells together with a reporter vector (pRE- Δ tk-Luc) containing three copies of the HRE from the erythropoietin gene and CMV- β gal to normalize for transfection efficiency. Cells were incubated in normoxia (20% O₂) or hypoxia (1% O₂) for 16 h and luciferase (LUC) and β -galactosidase (b-gal) activity were measured. WT, wild-type PHD3. (B) HEK293T cells were transfected with the PHD3 constructs, an NF- κ B luc-reporter and SV40- β gal. Luciferase and β -galactosidase activity was measured after 16 h of TNF α (20 ng/ml) treatment. The values represent the percentage of the LUC: β -gal activity relative to that of the control cells (treated). In parallel, cells were transfected to analyze protein expression levels by western blotting (WB). Results show the mean \pm s.e.m. (at least three independent experiments performed in triplicate); # P <0.05 versus wild-type PHD3.

cellular extracts (Fig. 4A, right panel). No major differences in the stability of PHD3–SUMO conjugates compared with that of the non-modified PHD3 were observed. Furthermore, we evaluated the half-life of the different PHD3 mutants. As shown in Fig. 4B, the three constructs showed similar behavior, suggesting that SUMOylation does not affect PHD3 stability. To consolidate these data, we also evaluated the impact of Siah2, the ubiquitin E3 ligase that is reported to trigger PHD3 proteasomal degradation (Nakayama et al., 2004). We transfected cells with the different PHD3 mutants with and without Myc–Siah2 and analyzed their expression levels (Fig. 4C). Siah2 overexpression induced degradation of wild-type PHD3, PHD3–SUMO2/3 and PHD3 Δ SUMO constructs to a similar extent. These results suggest again that SUMOylation is unlikely to affect PHD3 stability. The data shown are supported by the fact that PHD3 Δ SUMO is similarly ubiquitinated to wild-type PHD3 (data not shown). Therefore, unlike other targets such as I κ B α , SUMO would not compete with ubiquitin to stabilize PHD3 (Desterro et al., 1998).

We next analyzed the effect of SUMO on PHD3 intracellular localization. We transfected the different HA-tagged constructs

into HeLa cells and performed immunofluorescence assays (supplementary material Fig. S3). In agreement with previous reports (Metzen et al., 2003), wild-type PHD3 showed nuclear and cytoplasmic localization. PHD3 SUMO mutants exhibited similar localization compared with that of the wild-type protein, indicating that SUMO does not affect PHD3 localization.

Consequences of PHD3 SUMOylation on HIF1 α protein levels

Among the complex mechanisms underlying HIF activation, PHD-mediated regulation of HIF α stability through hydroxylation plays an essential role. Thus, one scenario could be that SUMOylation optimizes PHD3 hydroxylase activity. We tested this possibility using a commercially available antibody that specifically recognizes hydroxylated P564 (P564OH), as we have confirmed (supplementary material Fig. S4A,B). In contrast to our initial hypothesis, wild-type PHD3, PHD3–SUMO2/3 and PHD3 Δ SUMO proteins were equally competent to hydroxylate HIF1 α P564, either in the presence or in the absence of the proteasome inhibitor, MG132 (Fig. 5A,B). Hence, we found no evidence that SUMOylation directly affects PHD3 hydroxylation activity, at least on HIF1 α P564, and therefore, HIF1 α protein levels.

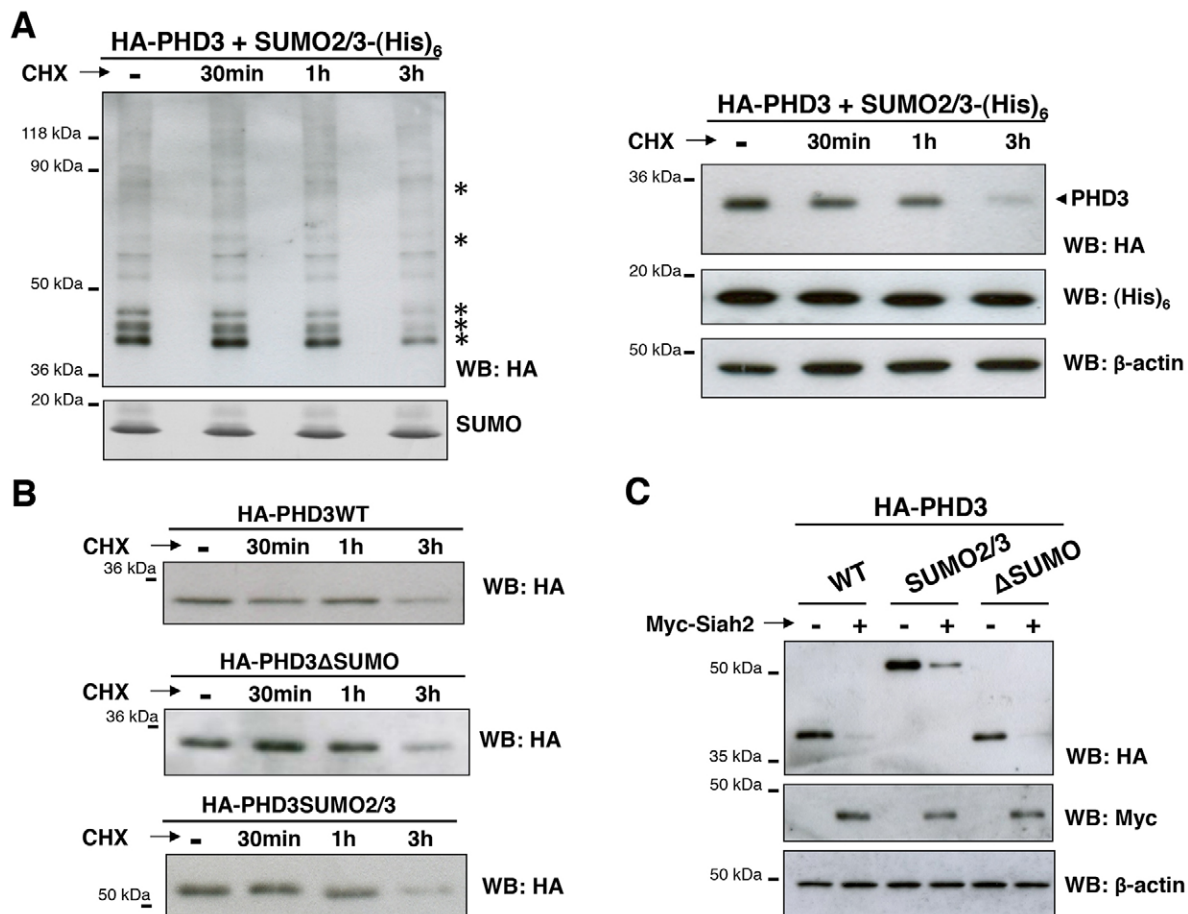


Fig. 4. PHD3–SUMO conjugation does not affect protein stability. (A) HEK293T cells transfected with PHD3 and SUMO2/3–(His)₆ were incubated in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX, 20 μ g/ml) for the indicated periods of time. SUMO-conjugated proteins (asterisks) were purified on Ni-NTA beads, resolved by SDS-PAGE and visualized by western blotting (WB, left panel). In parallel, the expression levels of the non-modified PHD3 (arrowhead) were analyzed by western blotting from the total cell extracts (right panel). (B) HEK293T cells were transfected with the different PHD3 constructs and incubated in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (20 μ g/ml) for the indicated periods of time. Finally, the expression levels of the PHD3 constructs were analyzed by western blotting from the total cell extracts. (C) HEK293T cells were transfected with the different PHD3 constructs with or without Myc–Siah2. Total protein extracts were resolved by SDS-PAGE and expression levels were visualized by using western blotting. β -actin was used as the protein loading control. WT, wild-type PHD3.

PHD3 SUMOylation optimizes repression of HIF1 transactivation activity

An alternative scenario could be that SUMOylation affects HIF1 transactivation activity per se. To investigate this issue, we analyzed the impact of PHD3 mutants on the transcriptional activity triggered by a constitutively expressed HIF1 α (HIF1-DM). As shown in Fig. 5C, the expression of wild-type PHD3 significantly repressed HIF-dependent activation of the HRE-Luc reporter gene. Surprisingly, PHD3 Δ SUMO was a weaker inhibitor, whereas PHD3-SUMO2/3 and PHD3 Δ SUMO-SUMO2/3 behaved as stronger inhibitors compared with the activity of the wild-type protein (Fig. 5C). Note that mutation of the two proline residues released HIF1 α from PHD3-dependent degradation, but it did not prevent inhibition of HIF-dependent transactivation. By contrast, silencing of endogenous UBC9 or SUMO3 expression by shRNAs significantly reduced PHD3-mediated HIF repression (supplementary

material Fig. S4C). To determine whether PHD3 hydroxylase activity was implicated in the repression of HIF1 transactivation activity, we transfected cells as described previously but including the PHD3 H196A mutant (supplementary material Fig. S4D). This experiment clearly showed that PHD3 catalytic activity is not required to repress HIF transactivation.

Finally, we analyzed the impact of PHD3 mutants on the expression levels of two endogenous HIF1 target genes – *CA9* and *GLUT1* (also known as *SLC2A1*). Supporting our data on reporter gene expression, wild-type PHD3 repressed *CA9* and *GLUT1* mRNA levels. Furthermore, PHD3 Δ SUMO and PHD3-SUMO2/3 were a weaker and a stronger repressor, respectively, compared with the activity of the wild-type protein (Fig. 5D). Taken together, these data demonstrate that PHD3 represses HIF1 transcriptional activity in a hydroxylase-independent manner and also that PHD3 SUMOylation optimizes such repression.

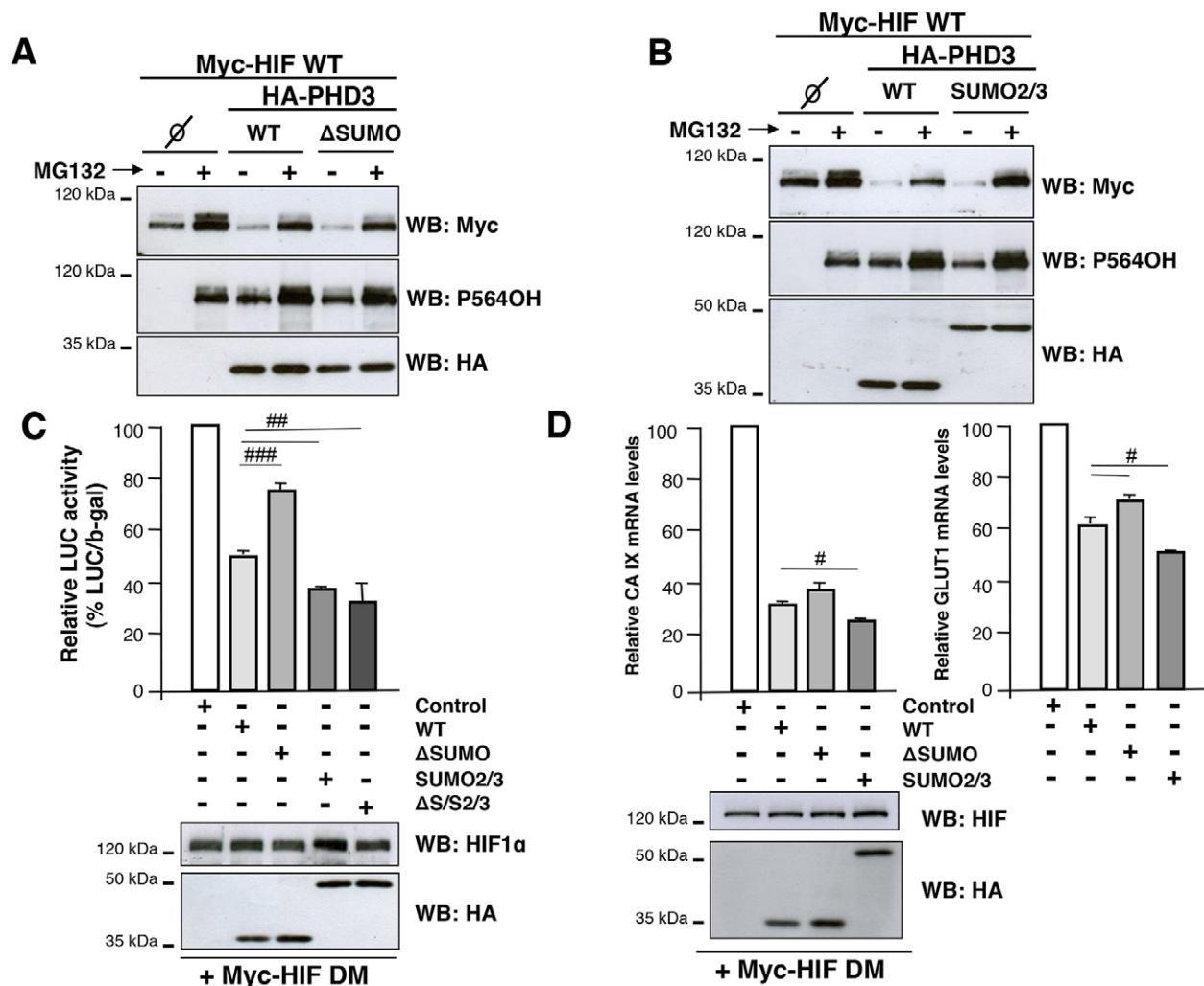


Fig. 5. PHD3 SUMOylation represses HIF1-dependent transactivation without affecting HIF1 α protein levels. (A,B) HEK293T cells were transfected with wild-type (WT) Myc-HIF1 and wild-type PHD3 or the different PHD3-SUMO mutants PHD3 Δ SUMO (A) and PHD3-SUMO2/3 (B). Cells were lysed after 4 h of MG312 treatment (10 μ M) and proteins were detected by using western blotting (WB). \emptyset , empty vector. (C) HEK293T cells were transfected with Myc-HIF1-DM (P402/564A), the indicated PHD3 constructs, the HRE-Luc reporter vector and CMV- β gal to normalize for transfection efficiency. Luciferase (LUC) and β -galactosidase (b-gal) activity were measured in cells incubated in normoxia (20% O₂). (D) HEK293T were transfected with Myc-HIF1-DM (P402/564A) and the indicated PHD3 constructs. The endogenous levels of *CA9* (*CA IX*) and *GLUT1* were analyzed by qRT-PCR. The values represent the percentage of the mRNA relative to that of the control cells. In parallel, cells were transfected to analyze protein expression levels by western blotting. Results are the mean \pm s.e.m. (at least three independent experiments performed in triplicate); #*P*<0.05; ##*P*<0.01; ###*P*<0.001 versus wild-type PHD3.

Hypoxia modulates PHD3 SUMOylation

We have previously shown that PHD3 participates in a feedback loop to suppress HIF1 activation in response to prolonged hypoxia (Ginouvés et al., 2008). The role of PHD3 SUMOylation in the repression of HIF-dependent transactivation prompted us to investigate whether hypoxia might regulate the conjugation of SUMO to PHD3. In line with our previous work, we conducted a timecourse study to evaluate the levels of PHD3–SUMO conjugates at different time-points of hypoxia (Fig. 6A). Interestingly, we observed that PHD3 SUMOylation was reduced after 4 h of hypoxia, whereas the levels of SUMOylated PHD3 recovered at prolonged hypoxia. These results demonstrate that hypoxia modulates PHD3 SUMOylation and show that the levels of PHD3–SUMO inversely correlate with an active HIF response.

The hypoxic response is primarily triggered by the inactivation of enzymes that belong to the family of 2-oxoglutarate and iron-dependent dioxygenases. Consequently, we wondered whether the activity of these enzymes might also affect PHD3 SUMOylation. Thus, we expressed PHD3 together with (His)₆-tagged SUMO2/3 and treated cells with DMOG, a pan-hydroxylase inhibitor. We found no evidence that hydroxylase activity affects PHD3 SUMOylation (Fig. 6B). Therefore, hypoxia-mediated modulation of PHD3 SUMO conjugation is independent of dioxygenase activity.

DISCUSSION

PHDs drive oxygen-dependent HIF α hydroxylation, which triggers protein ubiquitylation and further degradation by the proteasome. Therefore, oxygen is a master regulator of PHDs, although additional players have been shown to modulate these enzymes. The present study focused on SUMOylation as a potential PHD3 regulator. So far, hypoxia-dependent ubiquitin modification, catalyzed by the ubiquitin E3 ligase Siah2, is the only PTM described for PHD3 (Nakayama et al., 2004). Such ubiquitylation leads to PHD3 targeting for proteasomal degradation, and therefore modulates the response to hypoxia. In this report, we have demonstrated for the first time that PHD3 can be a SUMO target *in vitro* and in cultured cells. However, as reported for most of the SUMO targets, only a small fraction of PHD3 appears to be modified (Da Silva-Ferrada et al., 2012).

Although the *in vitro* SUMOylation assay showed one major PHD3–SUMO band, our mutational analysis indicates that mutation of four lysines (corresponding to the minimal PHD3 Δ SUMO mutant) was required to abolish PHD3 SUMOylation. Based on the close proximity of the four lysines within the cluster, it is tempting to speculate that although they are all likely to be modified, SUMOylation only occurs on one of the residues each time. PHD3 SUMOylation takes place at a non-consensus site in the C-terminal end of the protein. However, the SUMO acceptor site in PHD3 is

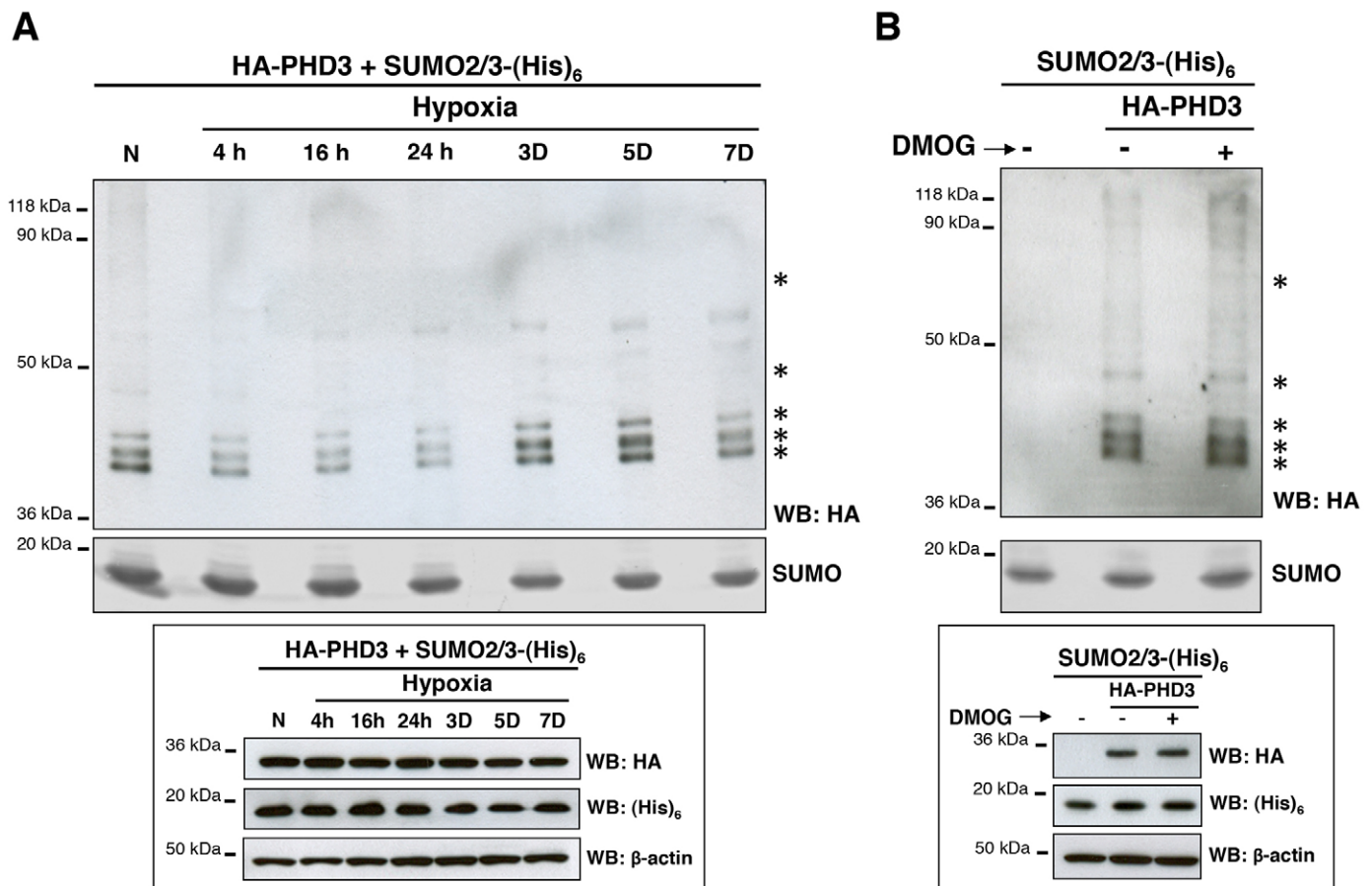


Fig. 6. Hypoxia but not DMOG regulates PHD3 SUMOylation. (A) HEK293T cells incubated in normoxia (N; 20% O₂) or hypoxia (1% O₂) for different times were transfected with PHD3 and SUMO2/3–(His)₆ 48 h before cell lysis. (B) HEK293T cells were transfected as described for A and incubated in the absence or the presence of the hydroxylase inhibitor DMOG (1 mM) for 4 h prior to cell lysis. SUMO-conjugated proteins were purified on Ni-NTA beads, resolved by SDS-PAGE and visualized by using western blotting (WB). SUMO-conjugated proteins are indicated by asterisks. Insets show the protein expression levels from total cell extracts transfected in parallel. β -actin was used as the protein loading control.

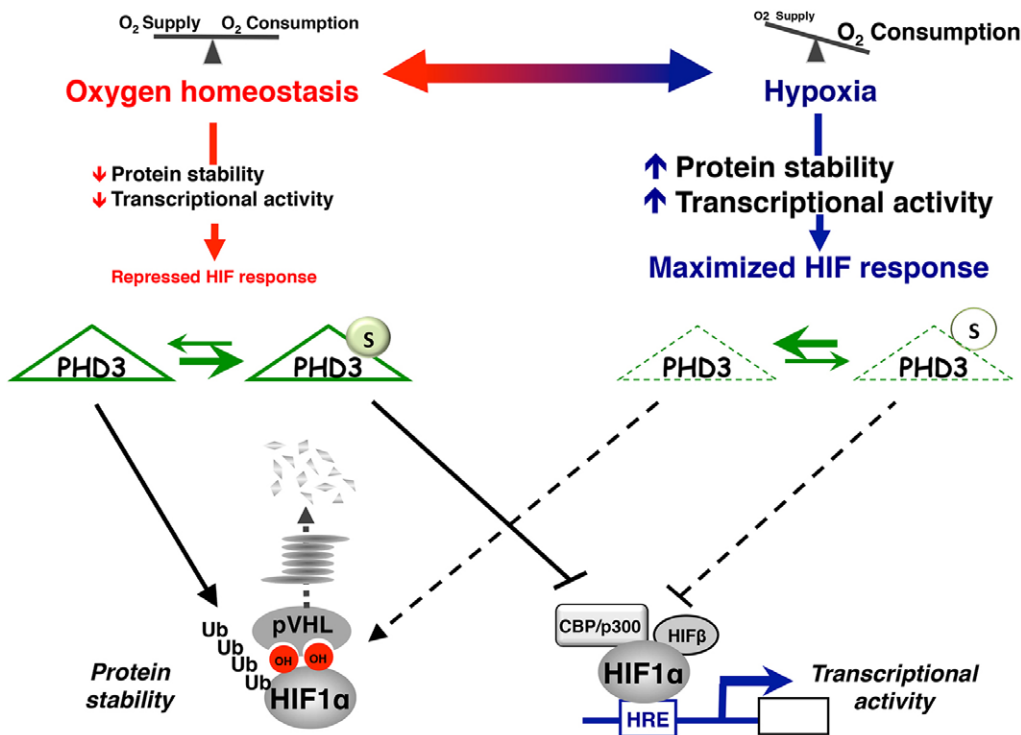


Fig. 7. A dual role for PHD3 in HIF1 repression. Besides the well-characterized role of PHD3 as a HIF1 repressor through destabilizing HIF1 α , PHD3 contributes to the inhibition of HIF1-dependent transcriptional activity per se. Moreover, PHD3 SUMOylation ('S') is required for the optimal repression of HIF1 transactivation. Hypoxia-modulated PHD3 SUMOylation appears to be a newly identified step in fine-tuning the control of HIF1 activation to ensure survival regardless of oxygen availability. Ub, ubiquitylation; OH, hydroxylation.

contained in the context of an alpha helix, as has been reported for substrates that do not conform to the consensus acceptor motif (Knipscheer et al., 2008; Pichler et al., 2005).

The unique PHD3–SUMO band detected *in vitro* also contrasts with the multiple SUMO-conjugates detected in cultured cells, which might result from poly-SUMOylation by SUMO2/3. Indeed, SUMO2 and SUMO3, but not SUMO1, contain an internal canonical SUMOylation site (K¹¹) that allows the formation of SUMO chains (Tatham et al., 2001). Besides the migration pattern of PHD3–SUMO conjugates, our data showing that SUMO2/3-conjugates are more readily detected in cultured cells as well as the functional assays support a central role for SUMO2/3 in the modification of PHD3. Otherwise, the shift of some SUMO-conjugates does not properly fit with the addition of 1, 2, 3 or more SUMO molecules. Thus, we cannot exclude the possibility that this shift might correspond to additional PTMs. Moreover, the interplay between SUMOylation and other PTMs has been extensively reported.

Our data provide new evidence for a dual role of PHD3 in HIF regulation as reported previously for EGL-9 in *Caenorhabditis elegans* (Shao et al., 2009) and PHD2 in mammals (Ozer et al., 2005; To and Huang, 2005). However, these results disagree with a more recent report claiming that PHD3 is a HIF1 coactivator through hydroxylation-mediated recruitment of PKM2 (Luo et al., 2011). In addition to the canonical role as the oxygen sensor that regulates HIF α stability, Powell-Coffman's group showed evidence that EGL-9 (the unique nematode ortholog of the PHD proteins) inhibits HIF1 transcriptional activity through a mechanism that does not implicate the hydroxylase activity. Supporting this prior study, our findings show the first evidence for a role of a mammalian PHD (in this case PHD3) as a HIF repressor independent of the hydroxylase activity. Moreover, we show here that PHD3 SUMOylation by SUMO2/3 mediates the non-canonical role of PHD3 as a HIF1 transcriptional repressor. Direct SUMOylation of transcription factors, which is mostly associated with transcriptional repression, arises as one of the most frequent functions attributed to SUMO in eukaryotic cells

(Ouyang et al., 2009). By contrast, our data support an indirect role of PHD3 SUMOylation in transcriptional repression, as recently shown for I κ B α (Mulero et al., 2013).

Contrary to the global SUMOylation increase induced by hypoxia, de-SUMOylated HIF1 α , HIF2 α , p300 and CBP correspond to the stable and/or active entities responsible for HIF activation (Cai et al., 2010; Cheng et al., 2006; Huang et al., 2009; van Hagen et al., 2010). Our results support this model, because PHD3 de-SUMOylation mirrors maximum HIF activation (Fig. 7). Whether hypoxia affects the machinery for PHD3 SUMOylation and/or de-SUMOylation or whether a second PTM is involved in this regulation remains to be explored.

Here, PHD3 SUMOylation is highlighted as an additional step among the extensive and dynamic mechanisms that are likely to be required to subtly adjust HIF function and to ensure survival regardless of oxygen availability. This complexity reflects not only the crucial role of HIF1 in maintaining oxygen homeostasis but also the need to safeguard against its inappropriate activation. Previous reports have linked the PHD3–HIF and SUMOylation pathways with pathologies such as cancer and ischemia (Cheng et al., 2006; Chen et al., 2011; Flotho and Melchior, 2013; Fox et al., 2011; Loinard et al., 2009; Mo et al., 2005; Silveirinha et al., 2013; Su et al., 2010; Wang and Banerjee, 2004; Xue et al., 2010). In light of these findings, there is a great interest in the development of drugs targeting these pathways. However, targeting global SUMOylation and/or the HIF response might have widespread toxicity and side effects. We anticipate that deciphering the specific SUMO E3 ligase and/or SUMO protease involved in PHD3 SUMOylation would facilitate the identification of more specific and secure targets and, therefore, provide alternative therapies.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

The HA–PHD3 Nter construct was generated by digestion of the pcDNA3–HA–PHD3 plasmid with *Bam*HI and *Eco*RI, filling to give blunt

ends, and re-ligation. HA-PHD3 Cter was generated by PCR amplification using HA-PHD3 as the template and the oligos 5'-GCAA-ATACAGATCTATGGAGAGGTCTAAG-3' and 5'-CTGATGGCGGC-CTCTCAGTCTTCAGTGAG-3'. The PCR product was digested with *Bgl*II and *Nor*I and cloned into the pcDNA3-HA vector that had been digested previously with *Bam*HI and *Nor*I. The pcDNA4-PHD3-(His)₆ construct was generated by digestion of HA-PHD3 with *Hind*III and *Eco*RI and cloning into the pcDNA4-(His)₆ plasmid. The pcDNA4-PHD3 SUMO1-(His)₆ chimera was generated by PCR amplification of SUMO1-(His)₆ with the oligos 5'-CATGGTGTGCTGAGTGTCTGAC-3' and 5'-GTGGATCCTAACTCGAGGTTTG-3'. The PCR product was digested with *Pst*I and *Xho*I and cloned into the pcDNA4-PHD3-(His)₆ plasmid that had been digested previously with the same enzymes. pcDNA4-PHD3 SUMO2/3-(His)₆ was generated using the same strategy and the oligos 5'-CATGGTGTGCTGAGTGTCCGAG-3' and 5'-GAATTCCTA-CTCGAGGTCTG-3'. The PHD3 mutants were obtained using the QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Primer sequences used for mutagenesis are listed in supplementary material Table S1. pCMV-Myc-HIF wild type and DM (P402/564A), pcDNA3-HA-PHD3, CMV-βgalactosidase, pRE-Δtk-Luc-HRE, pcDNA3-SUMO1-(His)₆, pcDNA3-SUMO2/3-(His)₆, pcDNA3-HA-SUMO1 and pcDNA3-HA-SUMO2/3 were as described previously (Berra et al., 2003; Desterro et al., 1998; Ginouvès et al., 2008; Tatham et al., 2001; Vertegaal et al., 2004). All of the constructs were sequence verified. Validated pools of shRNAs are from Open Biosystems.

In vitro SUMOylation assays

According to the manufacturer's protocol, the indicated PHD3 constructs were synthesized using the TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kit (Promega) supplemented with L-[³⁵S]-methionine (PerkinElmer). A volume of 2 μl of the [³⁵S]-labeled IVTT PHDs were used for SUMOylation assays (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂) in the presence of SAE1 and SAE2 (0.109 μM, Enzo/BioMol), ATP (2 mM), creatine phosphate (10 mM), creatine kinase (3.5 U/ml), pyrophosphatase (1 U/ml) and recombinant UBC9 (3.6 μM), SUMO (80 μM) or GST-SUMO (50 μM). After 2 h at 30°C, the reactions were stopped and resolved by SDS-PAGE. Migrated gels were stained with Coomassie Brilliant Blue, dried and exposed. All of the SUMOylation assays were performed at least three times.

Cell culture and transfections

COS7, HeLa and HEK293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 5% FBS. Cells were incubated at 37°C at 95% humidity and 5% CO₂. Hypoxic conditions were generated by incubation of cells in an anaerobic workstation (*In vivo* 400, Ruskinn). For hypoxic kinetics, HEK293T cells (supplemented with 10% FBS, 20 mM HEPES and ampicillin-streptomycin) were exposed to 1% O₂ for 7, 5 or 3 days or 24, 16 or 4 h prior to lysis. During longer timecourses, cells were split and seeded inside the workstation to obtain 80% confluence at the time of lysis. Cell extraction was performed inside the anaerobic workstation to avoid reoxygenation. Cells were transfected at 60–70% confluence 24 h post-seeding using the indicated DNA with FuGENE6 (Roche), Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or ArrestIN (Open Biosystems) as transfection reagents.

Ni-NTA purification and immunoblotting

To purify on Ni-NTA beads, cells were lysed (6 M guanidium, 0.1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl pH 8.0) and the extracts were incubated with the beads (Qiagen) in the presence of 10 mM β-mercaptoethanol for 2.5 h at room temperature. After two sequential washes using urea buffers (8 M urea, 0.1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, 10 mM β-mercaptoethanol) equilibrated first at pH 8.0 and then at pH 6.3, the purified proteins were eluted with 3× disruption buffer (150 mM Tris-HCl pH 6.8, 6% SDS, 30% glycerol, 10% β-mercaptoethanol, Bromophenol Blue) containing 200 mM imidazole. For total cell extracts, cells were lysed with Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 1.25% SDS, 15% glycerol). Following quantification using the Lowry assay, the proteins were resolved by SDS-PAGE and electrophoretically transferred onto a PVDF membrane (Millipore). The following antibodies were used for

immunoblotting: mouse anti-HA.11 (BAbCO/Covance), mouse anti-β-actin (Sigma), rabbit anti-SUMO2/3 (Eurogentec), mouse anti-(His)₆ (Novagen), mouse anti-Myc (Cell Signaling Technology), rabbit anti-HIF-P564OH (Cell Signaling Technology), rabbit anti-HIF1α (Richard et al., 1999). Immunoreactive bands were visualized with ECL.

Reporter assays and qRT-PCR

Cells were lysed in 25 mM Tris phosphate pH 7.8, 8 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 7.5% glycerol and 1 mM DTT. Luciferase activity measurement was performed using the Steadylyte plus™ High Sensitivity Luminescence Reporter Gene Assay System (PerkinElmer). β-galactosidase activity measurement was performed using the Galacto-Light Plus system (Applied Biosystems).

Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), reverse transcribed and amplified with the quantitative PCR MasterMix Plus for SYBR Green I (Roche). PCR was carried out in a C1000™ Thermal cycler (Bio-Rad). *RPLP0* was used for normalization. The primer sequences are available upon request.

Immunofluorescence

HeLa cells were fixed in 3% paraformaldehyde for 30 min at 37°C. After several washes with PBS, cells were permeabilized for 5 min with 0.2% Triton X-100 and blocked for 30 min in PBS solution containing 0.2% gelatin and 2% bovine serum albumin (BSA). Then cells were incubated with mouse anti-HA.11, donkey anti-mouse-IgG conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen) and DAPI. Cells were analyzed with a fluorescent microscope, the Axio Imager D1 (Zeiss), using structured illumination (Apotome accessory) with a 63× objective. Images were taken with an AxioCam HRm camera (Zeiss) operated by AxioVision Rel 4.8 software.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± s.e.m. Differences were examined by Student's *t*-test (two-tailed) between two groups or by one-way analysis of variance (ANOVA) within multiple groups. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgements

We thank Dr Roser Buscà (IRCAN, Nice, France) for critical reading of the manuscript and Dr Cormac T. Taylor (Conway Institute-University College Dublin, Dublin, Ireland), Dr María del Mar Vivanco (CIC bioGUNE, Derio, Spain) and Dr Sylvie Gisselbrecht (Cochin Hospital, Paris, France) for generously providing NF-κB-Luc, SV-40-β-galactosidase and pBK-CMV-Myc-Siah2 plasmids. We are indebted to Dr Amandine Ginouvès and Dr Melanie Berta for their support.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author contributions

A.N., A.G., S.P., O.C., B.U. and F.L. performed the experiments; A.N. and M.R. contributed to the writing of the manuscript and to analyze data; E.B. designed and supervised the project, analyzed data and wrote the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad [grant numbers SAF2007-64597 and SAF1010-20067 to E.B.]. A.N. and A.G. are funded by FPI fellowships [grant numbers BES-2008-003163 and BES-2011-047721]. The authors would also like to thank the HypoxiaNet COST Action-TD0901 for support.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.151514/-DC1>

References

- Benizri, E., Ginouvès, A. and Berra, E. (2008). The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 1133–1149.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D. and Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1α in normoxia. *EMBO J.* **22**, 4082–4090.
- Bruick, R. K. and McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337–1340.

- Cai, Q., Verma, S. C., Kumar, P., Ma, M. and Robertson, E. S. (2010). Hypoxia inactivates the VHL tumor suppressor through PIASy-mediated SUMO modification. *PLoS ONE* **5**, e9720.
- Chen, S., Zhang, J., Li, X., Luo, X., Fang, J. and Chen, H. (2011). The expression of prolyl hydroxylase domain enzymes are up-regulated and negatively correlated with Bcl-2 in non-small cell lung cancer. *Mol. Cell. Biochem.* **358**, 257–263.
- Cheng, J., Bawa, T., Lee, P., Gong, L. and Yeh, E. T. (2006). Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia* **8**, 667–676.
- Da Silva-Ferrada, E., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., Rodríguez, M. S. and Matthiesen, R. (2012). Strategies to identify recognition signals and targets of SUMOylation. *Biochem. Res. Int.* **2012**, 875148.
- Desterro, J. M., Rodríguez, M. S. and Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol. Cell* **2**, 233–239.
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A. et al. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**, 43–54.
- Flotho, A. and Melchior, F. (2013). Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 357–385.
- Fox, S. B., Generali, D., Berruti, A., Brizzi, M. P., Campo, L., Bonardi, S., Bersiga, A., Allevi, G., Milani, M., Aguggini, S. et al. (2011). The prolyl hydroxylase enzymes are positively associated with hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in human breast cancer and alter in response to primary systemic treatment with epirubicin and tamoxifen. *Breast Cancer Res.* **13**, R16.
- Fu, J. and Taubman, M. B. (2010). Prolyl hydroxylase EGLN3 regulates skeletal myoblast differentiation through an NF- κ B-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 8927–8935.
- Fu, J., Menzies, K., Freeman, R. S. and Taubman, M. B. (2007). EGLN3 prolyl hydroxylase regulates skeletal muscle differentiation and myogenin protein stability. *J. Biol. Chem.* **282**, 12410–12418.
- Geiss-Friedlander, R. and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 947–956.
- Ginouvès, A., Ilc, K., Macias, N., Pouyssegur, J. and Berra, E. (2008). PHDs overactivation during chronic hypoxia “desensitizes” HIF1 α and protects cells from necrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 4745–4750.
- Hay, R. T. (2007). SUMO-specific proteases: a twist in the tail. *Trends Cell Biol.* **17**, 370–376.
- Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M. and Bunn, H. F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* **271**, 32253–32259.
- Huang, 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. *EMBO J.* **28**, 2748–2762.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S. and Kaelin, W. G., Jr (2001). HIF1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464–468.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J. et al. (2001). Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468–472.
- Kelley, L. A. and Sternberg, M. J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**, 363–371.
- Knipscheer, P., Flotho, A., Klug, H., Olsen, J. V., van Dijk, W. J., Fish, A., Johnson, E. S., Mann, M., Sixma, T. K. and Pichler, A. (2008). Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol. Cell* **31**, 371–382.
- Köditz, J., Nesper, J., Wottawa, M., Stiehl, D. P., Camenisch, G., Franke, C., Myllyharju, J., Wenger, R. H. and Katschinski, D. M. (2007). Oxygen-dependent ATF-4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor. *Blood* **110**, 3610–3617.
- Lee, S., Nakamura, E., Yang, H., Wei, W., Linggi, M. S., Sajan, M. P., Farese, R. V., Freeman, R. S., Carter, B. D., Kaelin, W. G., Jr et al. (2005). Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell* **8**, 155–167.
- Loinard, C., Ginouvès, A., Vilar, J., Cochain, C., Zouggari, Y., Recalde, A., Duriez, M., Lévy, B. I., Pouyssegur, J., Berra, E. et al. (2009). Inhibition of prolyl hydroxylase domain proteins promotes therapeutic revascularization. *Circulation* **120**, 50–59.
- Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Malley, R., Cole, R. N., Pandey, A. and Semenza, G. L. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **145**, 732–744.
- Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J. H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W. Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Bürgel, T., Jelkmann, W., Acker, H. and Fandrey, J. (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J. Cell. Sci.* **116**, 1319–1326.
- Mo, Y. Y., Yu, Y., Theodosiou, E., Ee, P. L. and Beck, W. T. (2005). A role for Ubc9 in tumorigenesis. *Oncogene* **24**, 2677–2683.
- Mulero, M. C., Ferrer-Marco, D., Islam, A., Margalef, P., Pecoraro, M., Toll, A., Drechsel, N., Charneco, C., Davis, S., Bellora, N. et al. (2013). Chromatin-bound I κ B α regulates a subset of polycomb target genes in differentiation and cancer. *Cancer Cell* **24**, 151–166.
- Nakayama, K., Frew, I. J., Hagensen, M., Skals, M., Habelhah, H., Bhoumik, A., Kadoya, T., Erdjument-Braaten, H., Tempst, P., Frappell, P. B. et al. (2004). Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 α abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* **117**, 941–952.
- Núñez-O'Mara, A. and Berra, E. (2013). Deciphering the emerging role of SUMO conjugation in the hypoxia-signaling cascade. *Biol. Chem.* **394**, 459–469.
- Ouyang, J., Valin, A. and Gill, G. (2009). Regulation of transcription factor activity by SUMO modification. *Methods Mol. Biol.* **497**, 141–152.
- Ozer, A., Wu, L. C. and Brückner, R. K. (2005). The candidate tumor suppressor ING4 represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 7481–7486.
- Pichler, A., Knipscheer, P., Oberhofer, E., van Dijk, W. J., Körner, R., Olsen, J. V., Jentsch, S., Melchior, F. and Sixma, T. K. (2005). SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 264–269.
- Richard, D. E., Berra, E., Gothi, E., Roux, D. and Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 32631–32637.
- Rodríguez, M. S., Dargemont, C. and Hay, R. T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J. Biol. Chem.* **276**, 12654–12659.
- Romero-Ruiz, A., Bautista, L., Navarro, V., Heras-Garvín, A., March-Díaz, R., Castellano, A., Gómez-Díaz, R., Castro, M. J., Berra, E., López-Barneo, J. et al. (2012). Prolyl hydroxylase-dependent modulation of eukaryotic elongation factor 2 activity and protein translation under acute hypoxia. *J. Biol. Chem.* **287**, 9651–9658.
- Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I. and Gill, G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol. Cell* **10**, 831–842.
- Salceda, S. and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* **272**, 22642–22647.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **148**, 399–408.
- Shao, Z., Zhang, Y. and Powell-Coffman, J. A. (2009). Two distinct roles for EGL-9 in the regulation of HIF-1-mediated gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **183**, 821–829.
- Silveirinha, V., Stephens, G. J. and Cimarosti, H. (2013). Molecular targets underlying SUMO-mediated neuroprotection in brain ischemia. *J. Neurochem.* **127**, 580–591.
- Su, H. L. and Li, S. S. (2002). Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene* **296**, 65–73.
- Su, Y., Loos, M., Giese, N., Hines, O. J., Diebold, I., Görlach, A., Metzen, E., Pastorekova, S., Friess, H. and Büchler, P. (2010). PHD3 regulates differentiation, tumour growth and angiogenesis in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **103**, 1571–1579.
- Takeda, K., Ho, V. C., Takeda, H., Duan, L. J., Nagy, A. and Fong, G. H. (2006). Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8336–8346.
- Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H. and Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J. Biol. Chem.* **276**, 35368–35374.
- Tempé, D., Piechaczyk, M. and Bossis, G. (2008). SUMO under stress. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 874–878.
- To, K. K. and Huang, L. E. (2005). Suppression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) transcriptional activity by the HIF prolyl hydroxylase EGLN1. *J. Biol. Chem.* **280**, 38102–38107.
- van Hagen, M., Overmeer, R. M., Abolvardi, S. S. and Versteeg, A. C. (2010). RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2 α . *Nucleic Acids Res.* **38**, 1922–1931.
- Versteeg, A. C., Ogg, S. C., Jaffray, E., Rodríguez, M. S., Hay, R. T., Andersen, J. S., Mann, M. and Lamond, A. I. (2004). A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 33791–33798.
- Wang, L. and Banerjee, S. (2004). Differential PIAS3 expression in human malignancy. *Oncol. Rep.* **11**, 1319–1324.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. and Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5510–5514.
- Xie, L., Xiao, K., Whalen, E. J., Forrester, M. T., Freeman, R. S., Fong, G., Gygi, S. P., Lefkowitz, R. J. and Stamlor, J. S. (2009). Oxygen-regulated beta(2)-adrenergic receptor hydroxylation by EGLN3 and ubiquitylation by pVHL. *Sci. Signal.* **2**, ra33.
- Xue, J., Li, X., Jiao, S., Wei, Y., Wu, G. and Fang, J. (2010). Prolyl hydroxylase-3 is down-regulated in colorectal cancer cells and inhibits IKK β independent of hydroxylase activity. *Gastroenterology* **138**, 606–615.
- Yan, B., Jiao, S., Zhang, H. S., Lv, D. D., Xue, J., Fan, L., Wu, G. H. and Fang, J. (2011). Prolyl hydroxylase domain protein 3 targets Pax2 for destruction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**, 315–320.
- Zhang, Q., Gu, J., Li, L., Liu, J., Luo, B., Cheung, H. W., Boehm, J. S., Ni, M., Geisen, C., Root, D. E. et al. (2009). Control of cyclin D1 and breast tumorigenesis by the EglN2 prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* **16**, 413–424.

Manuscrito 2

Heras-Garvin, A., March-Díaz, R., Viehweger, A., Jimenez, S., Navarro, V., Lara-Ureña, N., Gerpe, A., Hodson, E.J., Vizuite, M., Gutierrez, A., Ratcliffe, P.J., Bishop, T., Lopez-Barneo, J., Berra, E., Serrano-Pozo, A., Vitorica, J., Pascual, A. Hypoxia aggravates Alzheimer's disease via HIF-mediated microglial dysfunction (manuscrito en preparación).

Durante mi tesis hemos colaborado con el grupo del Dr. Alberto Pascual (IBIS, Sevilla) en el estudio de la relación entre hipoxia y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y en concreto, en la enfermedad de Alzheimer.

El estudio ha puesto de manifiesto que la hipoxia inhibe la proliferación de las células de microglía y su quimiotaxis hacia las placas de amiloide in cellulo e in vivo y en consecuencia, la hipoxia acelera el desarrollo de la enfermedad de Alzhéimer. Nuestra contribución se ha centrado en analizar el efecto de la hipoxia sobre la proliferación y viabilidad celular en un modelo celular de microglía, BV2. En particular, analizamos la contribución de HIF al efecto inhibitor de la hipoxia sobre la proliferación mediante ensayos de silenciamiento. Nuestros resultados muestran claramente que el silenciamiento conjunto de HIF-1 α e HIF-2 α es necesario para revertir la inhibición inducida por hipoxia en la proliferación de microglía.

Title: Hypoxia aggravates Alzheimer's disease *via* HIF-mediated microglial dysfunction

Authors: Antonio Heras-Garvin^{1,†}, Rosana March-Diaz^{1,†}, Adrian Viehweger^{1,2,‡}, Sebastian Jimenez^{1,3,4}, Victoria Navarro^{1,3,4}, Nieves Lara-Ureña¹, Almudena Gerpe⁵, Emma J. Hodson⁶, Marisa Vizuete^{1,3,4}, Antonia Gutierrez^{3,7}, Peter J. Ratcliffe⁶, Tammie Bishop⁶, Jose Lopez-Barneo^{1,3}, Edurne Berra⁵, Alberto Serrano-Pozo⁸, Javier Vitorica^{1,3,4}, and Alberto Pascual^{1,*}

Affiliations:

¹Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla. 41013 Seville, Spain.

²University of Leipzig, Medical Faculty, Department of Neurosurgery. 04103 Leipzig, Germany.

³Centro de Investigacion Biomedica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain.

⁴Dept. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

⁵Centro de Investigacion Cooperativa en Biociencias, CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia, 48160 Derio, Spain.

⁶Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, OX3 Oxford, UK.

⁷Dept. Biología Celular, Genética y Fisiología. Facultad de Ciencias. Instituto de Investigacion Biomedica de Malaga (IBIMA). Universidad de Malaga, Spain.

⁸Department of Neurology. University of Iowa Hospitals & Clinics, Iowa City, IA52242, USA

*Correspondence to: apascual-ibis@us.es

†Both authors equally contributed to this work.

‡Current address: Dept. of Pediatric Radiology. University Clinic Leipzig. 04103 Leipzig, Germany.

Abstract:

Hypoxia has long been associated with Alzheimer's disease (AD) but the molecular pathways underlying this interaction are poorly understood. Hypoxia regulates the innate immune system and extensive work has implicated microglia –the brain macrophages– in the pathophysiology of AD. Here we show that hypoxia leads to an intensification of both A β peptide accumulation and its downstream neurodegenerative processes. Hypoxia dramatically impacts microglia surrounding amyloid plaques reducing microglia number and coverage of A β plaques. Hypoxia produces microglial dysfunction characterized by cell cycle arrest and impairment of chemotaxis, mimicking the behavior of macrophages under low oxygen levels. HIF1 α genetic deletion indicates a crucial role of this protein in controlling microglial proliferative potential and microglia extracted from PHD-deficient mouse was also dysfunctional. Microglia primed towards a pro-inflammatory Alzheimer-like phenotype exhibit an exacerbated response to hypoxia characterized by the accumulation of HIF1 α . Remarkably, brains from AD patients exhibit an accumulation of HIF1 α and an up-regulation of HIF target genes that correlates with the progression of the disease. These observations help to explain the association between hypoxia and AD and are relevant to both AD prevention and therapeutics.

One Sentence Summary:

Hypoxia intensifies Alzheimer disease pathology by causing HIF/PHD-mediated microglia dysfunction.

Main Text:

Diseases causing chronic or intermittent hypoxia such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or sleep apnoea are associated with an increased risk of dementia and AD (1-3), and population-based clinico-pathologic studies have established that most cases of dementia in the elderly are due to a combination of cerebrovascular ischemia and AD pathologies (4, 5). Thus, a possible synergism between these two common aging-associated conditions has been postulated (reviewed in 6-8).

Hypoxia triggers an adaptive response via the oxygen-sensitive hypoxia-inducible factor (HIF). Hypoxia slows down the enzymatic activity of the oxygen sensors prolyl-hydroxylases (PHDs), reducing the rate of hydroxylation and subsequent proteasomal degradation of HIF α subunits (9, 10). Under hypoxia, HIF effector genes orchestrate the adaptation to low oxygen conditions by shifting cell metabolism to glycolysis and facilitating tissue oxygen delivery (11). Interestingly, the HIF/PHD pathway also regulates many aspects of the adaptive immune response and has been proposed as a therapeutic target in several inflammatory diseases (for reviews see 12-14). In particular, hypoxia regulates gene expression in macrophages to decrease their migratory potential (15), leading to their retention in specific inflammatory niches (16).

The association between AD and genetic *loci* encoding proteins with known roles in innate immunity has suggested that the immune system is a key player in AD pathobiology (17-23). Microglia are the immune cells of the adult brain and derive from macrophages of the yolk sac that migrate to the neuroepithelium during embryogenesis (24). In the AD brain, activated microglia cluster both within and around senile plaques –the extracellular deposits of fibrillar amyloid β peptide (A β) (25)– but their role remains controversial. Both phagocytosis of A β and

release of pro-inflammatory molecules are the most investigated and disputed roles of microglia in AD (26).

Herein we investigated whether and how hypoxia accelerates the AD pathological process. We found that microglia response to hypoxia mimics that of other innate immune cells (such as macrophages) and contributes to accumulation of A β peptide and aggravation of plaque-associated neurodegeneration.

Results

Hypoxia enhances A β accumulation

Because hypoxia is a major contributor to dementia in the elderly, we studied the contribution of hypoxia to the progression of an AD mouse model. We characterized the brain of 8 (young) and 14 (old) months old wild-type (WT) or *APP^{swe}; PSEN1 Δ 9* (AD) mice exposed to either normoxia (21% O₂) or chronic hypoxia (9% O₂) for 20 days. These ages correspond to the initial and advanced stages of the brain β -amyloidosis, respectively. As expected, hypoxia produced an increase in hematocrit that was not affected either by genotype or age (fig. S1). No infarctions or obvious disruption of the blood-brain barrier (Prussian blue staining) were observed in the hypoxic brains (data not shown). Previous studies have described the regulation of several amyloid precursor protein (APP)-processing and A β -degrading enzymes leading to increased A β levels by intermittent hypoxia, (27, 28). To test whether this observation also applies to sustained hypoxia, we estimated the levels of A β ₁₋₄₂ by ELISA in total brain extracts from old AD animals. We found no significant differences between hypoxia and normoxia (Fig. 1A). Moreover, no significant difference was observed in the levels of soluble APP α between normoxia and hypoxia (Fig. 1B). Accordingly, short (16 h) or chronic (30 days) hypoxia (9 % O₂) with or without reoxygenation did not produced any changes on A β metabolism. None of the mRNAs encoding the APP-processing and A β -degrading enzymes were regulated by hypoxia, with the exceptions of *Psen1* and *App*, which exhibited subtle, but significant changes after reoxygenation (fig. S2), further demonstrating that hypoxia does not impact APP processing or A β total amount.

However, we did observe a significant increase of both dense-core Thioflavin-S (Thio-S) positive plaque load and number in the cortex of hypoxic old AD mice compared to normoxic

littermates (Fig. 1C and D). Thio-S positive plaque load and number did not differ in hypoxic and normoxic mice hippocampus (Fig. 1D), a region where A β is known to deposit earlier but at a slower rate compared to the cortex (29). Analysis of the size distribution of cortical Thio-S plaques in hypoxic and normoxic old AD mice revealed that small size plaques were specifically increased in number (Fig. 1E), suggesting the formation of new dense-core plaques under hypoxia. We hypothesized that hypoxia produces an accumulation of soluble A β aggregates. OC is a conformation-specific anti-A β antibody that recognizes fibrillar oligomers in soluble extracts, A β fibrils in insoluble extracts and dense-core plaques in immunohistochemistry (30, 31). Hypoxic animals exhibited a clear accumulation of OC positive A β aggregates in cortical soluble extracts subjected to dot blot (Fig. 1F).

All together, these data indicate that chronic hypoxia leads to an increase in soluble A β fibrillar oligomers and newly formed fibrillar (Thio-S positive) deposits.

Hypoxia aggravates A β -induced neurodegeneration

Senile plaques are decorated with dystrophic neurites, which are a result of the direct neurotoxic effect of A β and can be displayed with both ubiquitin (UB) and phospho-tau (P-Tau) immunohistochemistry. Hypoxic old AD mice showed a clear increase in UB load in the vicinity of Thio-S positive dense-core plaques (Fig. 2A). The number of dystrophic neurites (P-Tau immunoreactive) per Thio-S positive plaque is also increased in the cortex of hypoxic old AD animals (Fig. 2B). NeuN immunostaining did not reveal obvious neuronal death (fig. S3) and activated caspase 3 immunostaining did not show increased apoptosis in hypoxic compared with normoxic AD mice (data not shown). Both somatostatin (SST) and neuropeptide Y (NPY) positive hippocampal interneurons has been reported to die at early stages in a similar AD mouse model (32), which we confirmed by measuring the hippocampal levels of *Sst* and *Npy* mRNAs

using qRT-PCR. Of note, hypoxia induced a clear further decrease of both markers in old AD mice exhibited compared with normoxic old AD mice (Fig. 2C).

Hypoxia impairs microglia proliferation *in vivo*

Microglia belong to the myeloid lineage (24), whose physiology is largely regulated by hypoxia (12-14). Since we observed an increase in soluble fibrillar A β , fibrillar A β deposits, and plaque-associated neuronal damage with exposure to hypoxia, we hypothesized that hypoxia could impair the barrier function exerted by microglia.

Interestingly, compared to normoxia, exposure to hypoxia induced a dramatic reduction in the number of ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1) immunoreactive microglia in old AD animals (Fig. 3A), whereas no statistical significant change was observed in either young AD or WT hypoxic animals (Fig. 3A and fig. S4). A closer examination of hippocampal and cortical regions of old AD mice (Fig. 3B) revealed that microglial cells surrounding the A β plaques either retracted or lost their processes or were simply absent under hypoxia (Fig. 3B). This observation was confirmed using tomato lectin as an independent microglial marker (Fig. 3B). Quantification of individual microglial cells and the area occupied by IBA1 immunoreactivity per Thio-S positive plaque demonstrated a substantial decrease in both hippocampus and cortex of old hypoxic AD animals (Fig. 3B). In sharp contrast, neither the number of reactive astrocytes immunoreactive for glial fibrillary acidic protein (GFAP) nor the number of total astrocytes (glutamine synthetase positive) was altered by hypoxia in either young or old AD animals (fig. S5A). Moreover, the ratio of astrocytes close to A β plaques versus total astrocytes was not significantly different (fig. S5A). The specific damage by hypoxia to microglia but not astrocytes in old AD animals was further confirmed by estimating the levels of *Iba1* and *Gfap* mRNA from hippocampal extracts using qRT-PCR (Fig. 3C and fig. S5B). Taken

together, these experiments demonstrate that hypoxia leads to a microglial depopulation of A β plaques.

Microglia accounts for most proliferating brain cells in plaque-bearing AD mouse models (33, 34). To determine whether chronic hypoxia (9% O₂, 20 days) results in microglia cell cycle arrest *in vivo*, we quantified the number of Ki67 positive microglial cells in both cortex and hippocampus of old AD animals. Hypoxia caused a ~63% reduction in the number of proliferating microglia in both brain regions (Fig. 3D). This percentage clearly exceeds the aforementioned reduction in the number of total (~25%) and plaque-associated microglia (~34%) (Fig. 3A and B), thus strongly supporting that chronic hypoxia impairs microglia proliferation *in vivo*.

Hypoxia induces microglia cell cycle arrest *via* HIF α stabilization

The formation of new A β plaques in the APP overexpressing mouse models is associated with microglia proliferation and chemotaxis towards them as an attempt to limit plaque growth (33-37), therefore we evaluated how hypoxia can affect both processes *in cellulo*.

To evaluate how hypoxia regulates proliferation of microglia we used two *in cellulo* models: the BV2 cell line (microglial derived) and primary cultures (see figure S6 for a characterization of these cultures). Low oxygen levels may control proliferation and can cause HCT116 cell cycle arrest (38). To determine if hypoxia (4 to 48 h, 1% O₂) modulates BV2 cell cycle, we measured the percentage of cells in G0/G1, S, or G2 using propidium iodide staining and flow cytometry. Brief hypoxia (4 h) did not change the BV2 cell cycle (data not shown); however, 24 and 48 h of hypoxia led to a dramatic cell cycle arrest that was fully reversed by 24 h of reoxygenation (Fig. 4A). This effect was not detected in HeLa cells cultured in parallel (data not shown). In order to

evaluate the involvement of HIF α subunits in the control of cell cycle under hypoxia, we interfered the expression of *Hif1 α* , *Epas1* or *Hif1 α* and *Epas1*. Although the degree of inhibition reached was small (around 50 – 60% of the levels of non-interfered cultures), we were able to observe a decrease in the hypoxia-induced cell cycle arrest when both genes were inhibited (data not shown). We also observed an increase under hypoxia of *Epas1* mRNA levels when *Hif1 α* was inhibited, suggesting the involvement of HIF α subunits in the control of hypoxia mediated microglia cell cycle arrest. In order to confirm the data obtained with cell lines, we estimated proliferation in microglia primary cultures exposed to 24 h of hypoxia (1% O₂), using a bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay. Hypoxia induced a strong decrease in BrdU incorporation, validating the data obtained with the BV2 cell line (Fig. 4B). To confirm the role of HIF1 α in the microglia cell cycle arrest induced by hypoxia we generated *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1 α ^{Flox/Flox}* conditional mice. In these animals, HIF1 α levels can be reduced specifically in microglia by treatment with tamoxifen (TMX). Compared to vehicle, TMX induced a > 85% reduction in the levels of *Hif1 α* mRNA in *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1 α ^{Flox/Flox}* microglia primary cultures as estimated by qRT-PCR (Fig. 4C). As a control, we did not observed modifications in HIF1 α levels by TMX treatment of microglia from wild-type animals (data not shown). Importantly, HIF1 α remained undetectable by western blot in TMX-treated *Cx3cr1-Cre::ERT2; Hif1 α ^{Flox/Flox}* microglia primary cultures despite pre-treatment with the hypoxia mimetic and PHDs inhibitor dimethylxalylglycine (DMOG). The same cultures were exposed to hypoxia and the number of BrdU positive microglial cells was estimated. As expected, hypoxia produced a ~ 60% decrease in the number of BrdU-positive cells. However, microglial proliferation was almost completely restored in TMX-treated HIF1 α -depleted cultures (Fig. 4C), demonstrating that HIF1 α contributes to microglia cell cycle arrest under hypoxia.

We also evaluated the role of PHDs in hypoxia-induced microglial dysfunction. PHD2 is the main regulator of HIF α stabilization (39) and both PHD2 and PHD3 can inhibit HIF α accumulation even under hypoxic conditions (40). We performed primary microglia cultures from either *Egln2*^{-/-} (PHD1), *Egln1*^{+/-} (PHD2), or *Egln3*^{-/-} (PHD3) mice and quantified the number of cells generated in culture. The number of microglial cells at 20 days in vitro was decreased both in the absence of PHD3 or in the presence of half dose of PHD2 (fig. S7), whereas no differences were observed in PHD1-deficient microglia (fig. S7).

Hypoxia impairs the chemotaxis of macrophages, trapping them in necrotic areas (12, 16). To investigate whether hypoxia also impairs microglia chemotaxis, BV2 cells were cultured in the presence of oligomeric A β . The number of BV2 cells in contact with A β aggregates was reduced under hypoxia, indicating that hypoxia inhibits their chemotaxis towards A β (fig. S8A). Similarly, using a Boyden chamber assay, the migration of primary microglia towards the A β -containing compartment was significantly decreased under hypoxia (fig. S8B). Similar results were observed using ATP as chemoattractant (fig. S8B), suggesting that hypoxia impairs microglia chemotaxis in a non-specific manner. All together, these data demonstrate that hypoxia inhibits both microglial cell cycle and chemotaxis *in cellulo*.

AD brains exhibit HIF α accumulation

As AD progresses, microglia is thought to change towards an activated phenotype (41, 42). There is a well-established cross talk between hypoxia and inflammation that leads to a cooperative increase of HIF α : hypoxia induces HIF α by slowing down PHDs activity whereas inflammation does so by up-regulating NF κ B signalling (43). Both microglial pro-inflammatory activation (41) and increased HIF levels (44) have been separately reported in AD mouse models, but whether microglia contributes to this accumulation of HIF has not been documented.

To address this hypothesis, we exposed microglia primary cultures to M-CSF and GM-CSF, two cytokines with antagonistic inductive roles over microglia, and evaluated microglia response to hypoxia. M-CSF differentiates microglia towards a phagocytic phenotype whereas GM-CSF gives rise to an antigen-presenting dendritic cell phenotype that can become pro-inflammatory upon interaction with an antigen (45, 46). We first verified that the treatment with these cytokines produced the expected phenotypic change in our microglia primary culture. GM-CSF induced an up-regulation of *tumor necrosis factor (Tnf)*, *arginase (Arg1)*, and *chitinase-like 3 (Chil3)* mRNA levels (fig. S9). Conversely, M-CSF treatment reduced the levels of *Tnf* (fig. S8).

Vehicle- and M-CSF-treated hypoxic microglia exhibited a modest response to hypoxia as revealed by western blot of HIF1 α (Fig. 4E) and qRT-PCR of *Phd2* mRNA, a HIF1 α target gene (Fig. 5A). By contrast, GM-CSF-treated hypoxic microglia expressed considerably higher levels of HIF1 α protein, at least in part due to a transcriptional up-regulation of the *Hif1 α* gene (Fig. 5A and B). These results were confirmed at a genome scale by using microarrays (March-Diaz et al., unpublished results). Thus, microglia primed towards an activated phenotype similar to that in the AD brain is more sensitive to hypoxia than resting or phagocytic microglia.

HIF1 α levels are increased in the brain of AD mouse models compared with WT animals (44). To validate the relevance of our observations with respect to AD human pathology, we quantified the levels of HIF1 α in hippocampal extracts from healthy young control individuals and elderly subjects at different Braak & Braak AD stages. Western blot showed a strong correlation between the progression of AD pathology and the levels of HIF1 α protein (Fig. 5C). However, a drop in the levels of HIF1 α was observed in advanced stages of the disease (Braak V and VI) when compared with intermediate stages (Braak III and IV), probably due to burn-out of the pathological process exemplified by dramatic cell death and cortical atrophy (47). To further

confirm HIF α activation in the brain of AD patients we estimated the mRNA levels of *Vegfa* and *Slc7a5*, respectively HIF1 α and HIF2 α target genes. Both genes accumulate paralleling the accrual of AD neuropathology (Fig. 5D); again reinforcing the idea that AD is associated with the accumulation of hypoxic markers and highlighting the possible role of the HIF/PHD pathway in AD pathophysiology.

Discussion

Epidemiologic studies have provided evidences that diseases associated with hypoxia are often comorbid with AD (7, 8). We show here that hypoxia augments the pathology of the *APP^{swE}*; *PSEN1 Δ 9* AD mouse model by increasing both accumulation of the A β peptide and A β -related downstream neurodegenerative phenomena. Although many possible cellular substrates can be associated with the acceleration of the pathology by hypoxia, our results point to a substantial contribution of the hypoxia-mediated microglia dysfunction in A β clearance and neuroprotection.

In vivo imaging in this and other plaque-bearing AD mouse models has revealed that dense-core amyloid plaques can form as rapidly as within 24 hours and that, once formed, they attract microglia to their vicinity within days (35, 48). This prominent microglial response to plaques is thought to result from the combination of chemotaxis towards the A β peptide (37, 49) and cell proliferation (33, 34, 50). We observed that hypoxia impacts negatively both microglia proliferation and chemotaxis towards amyloid plaques. These results are reminiscent of the regulation of innate immune cells by hypoxia through the HIF pathway (15, 16, 51-57), but whether microglia –its CNS counterpart (24)– shares this property was not known. Using a cell line and primary cultures, we show here that hypoxia induces a profound phenotypic change in microglia via cell cycle arrest and chemotaxis inhibition. Several lines of evidence indicate that sustained inflammation and hypoxia activate HIF1 α leading to inhibition of microglial proliferation and chemotaxis. First, the microglial dysfunctional phenotype induced by hypoxia was only observed in aged AD mice, in which the brain milieu is highly enriched in pro-inflammatory cytokines (26, 42). Second, activated microglia primary cultures (GM-CSF treated) were exquisitely sensitive to hypoxia, whereas amoeboid/phagocytic microglia (M-CSF

treated) exhibited a hypoxic response similar to resting (untreated) microglia. Third, hypoxia effects on microglial function could be recapitulated by PHD2 and PHD3 deficiency, which are associated with HIF α stabilization (40). Fourth, genetic inactivation of HIF1 α rescue the decrease in proliferation associated with hypoxia.

Other authors have previously described an increase in glycolytic enzymatic activities (44) and in *Vegfa* mRNA levels (58), two classical effectors of HIF1 α , in the human AD brains. In addition, HIF1 α protein accumulates in the brain of very old plaque-bearing AD mice (44). Herein we observed a positive correlation between HIF1 α protein levels and the progression of AD pathological changes as indicated by the Braak staging, suggesting that a hypoxic response parallels AD pathological progression and that our findings are relevant to the human disease. We also confirmed the previous described increase of *Vegfa* associated with AD progression (58) and extended the data to a HIF2 α target gen, *Slc7a5* (59).

All the results presented here suggest that the HIF pathway may have a role in the progression of AD by provoking microglial dysfunction. Notably, post-mortem studies in human AD brains have described that microglia loses proliferative potential (60) and adopts a senescent phenotype (61, 62) prior to its death by apoptosis (63, 64).

In summary, we discovered that hypoxia inhibits both microglia proliferation and chemotaxis, leading to an aggravation of Alzheimer-related phenotypes. Our findings indicate that inhibiting the HIF pathway in microglia may represent a novel therapeutic target in Alzheimer's disease.

Acknowledgments

This research was supported by the Spanish Ministries of Science and Innovation and Health (SAF2012-33816 and PIE13/00004) and by the regional Government of Andalusia (“Proyectos de Excelencia”, CTS2138). A.H.-G. received a predoctoral fellowship of the FPI program and R. M.-D. a contract from the “Sara Borrell” program. A.S.-P. was a recipient of non-overlapping fellowships from the Instituto de Salud Carlos III (currently “Río-Hortega program”, CM06/00161, Madrid, Spain) and the Fundación Alfonso Martín Escudero (Madrid, Spain). J.L.-B. was supported by the Botín Foundation. We are indebted to Alicia E. Rosales-Nieves and David A. Cano for their critical review of the manuscript. We thank Maria Jose Castro, Rocio Duran, and Konstantin Levitsky for technical assistance at the core services of IBiS.

References

1. M. Rusanen *et al.*, Chronic obstructive pulmonary disease and asthma and the risk of mild cognitive impairment and dementia: a population based CAIDE study. *Curr Alzheimer Res* **10**, 549–555 (2013).
2. K. Yaffe *et al.*, Sleep-disordered breathing, hypoxia, and risk of mild cognitive impairment and dementia in older women. *JAMA* **306**, 613–619 (2011).
3. B. Singh *et al.*, A prospective study of chronic obstructive pulmonary disease and the risk for mild cognitive impairment. *JAMA Neurol* **71**, 581–588 (2014).
4. J. A. Schneider, Z. Arvanitakis, W. Bang, D. A. Bennett, Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology* **69**, 2197–2204 (2007).
5. Neuropathology Group. Medical Research Council Cognitive Function and Aging Study, Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS). *Lancet* **357**, 169–175 (2001).
6. O. O. Ogunshola, X. Antoniou, Contribution of hypoxia to Alzheimer's disease: is HIF-1 α a mediator of neurodegeneration? *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3555–3563 (2009).
7. B. V. Zlokovic, Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* **12**, 723–738 (2011).
8. C. Iadecola, The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* **80**, 844–866 (2013).
9. A. C. Epstein *et al.*, *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**, 43–54 (2001).
10. N. Masson, C. Willam, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* **20**, 5197–5206 (2001).
11. W. G. Kaelin Jr., P. J. Ratcliffe, Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Molecular Cell* **30**, 393–402 (2008).
12. M. C. Bosco *et al.*, Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology* **213**, 733–749 (2008).
13. S. R. Walmsley, E. R. Chilvers, M. K. Whyte, Hypoxia. Hypoxia, hypoxia inducible factor and myeloid cell function. *Arthritis Res Ther* **11**, 219 (2009).
14. A. Harris, A. A. R. Thompson, M. K. B. Whyte, S. Walmsley, HIF-mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications. *HP*, 47 (2014).

15. H. Y. Fang *et al.*, Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood* **114**, 844–859 (2009).
16. L. Turner, C. Scotton, R. Negus, F. Balkwill, Hypoxia inhibits macrophage migration. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2280–2287 (1999).
17. J.-C. Lambert *et al.*, Implication of the immune system in Alzheimer's disease: evidence from genome-wide pathway analysis. *J. Alzheimers Dis.* **20**, 1107–1118 (2010).
18. T. E. Golde, W. J. Streit, P. Chakrabarty, Alzheimer's disease risk alleles in TREM2 illuminate innate immunity in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* **5**, 24 (2013).
19. P. Hollingworth *et al.*, Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics* **43**, 429–435 (2011).
20. A. Griciuc *et al.*, Alzheimer's Disease Risk Gene CD33 Inhibits Microglial Uptake of Amyloid Beta. *Neuron*, 1–13 (2013).
21. E. M. Bradshaw *et al.*, CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat. Neurosci.* **16**, 848–850 (2013).
22. T. Jonsson, K. Stefansson, TREM2 and neurodegenerative disease. *N Engl J Med* **369**, 1568–1569 (2013).
23. A. C. Naj *et al.*, Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics* **43**, 436–441 (2011).
24. F. Ginhoux *et al.*, Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**, 841–845 (2010).
25. H. W. Querfurth, F. M. LaFerla, Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **362**, 329–344 (2010).
26. K. M. Lucin, T. Wyss-Coray, Immune Activation in Brain Aging and Neurodegeneration: Too Much or Too Little? *Neuron* **64**, 110–122 (2009).
27. X. Sun *et al.*, Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 18727–18732 (2006).
28. L. Li *et al.*, Hypoxia increases A β generation by altering β - and γ -cleavage of APP. *Neurobiology of Aging* **30**, 1091–1098 (2009).
29. M. Garcia-Alloza *et al.*, Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease* **24**, 516–524 (2006).
30. C. G. Glabe, Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* **283**, 29639–29643 (2008).
31. M. A. Chabrier *et al.*, Soluble A β Promotes Wild-Type Tau Pathology In Vivo. *Journal*

- of Neuroscience* **32**, 17345–17350 (2012).
32. B. Ramos *et al.*, Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **27**, 1658–1672 (2006).
 33. L. Bondolfi *et al.*, Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice. *Journal of Neuroscience* **22**, 515–522 (2002).
 34. W. Kamphuis, M. Orre, L. Kooijman, M. Dahmen, E. M. Hol, Differential cell proliferation in the cortex of the appsweps1de9 alzheimer's disease mouse model. *Glia* **60**, 615–629 (2012).
 35. M. Meyer-Luehmann *et al.*, Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* **451**, 720–724 (2008).
 36. A. Serrano-Pozo *et al.*, Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **72**, 462–471 (2013).
 37. J. El Khoury *et al.*, Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* **13**, 432–438 (2007).
 38. M. Koshiji *et al.*, HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* **23**, 1949–1956 (2004).
 39. E. Berra *et al.*, HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* **22**, 4082–4090 (2003).
 40. A. Ginouvès, K. Ilc, N. Macías, J. Pouyssegur, E. Berra, PHDs overactivation during chronic hypoxia “desensitizes” HIFalpha and protects cells from necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 4745–4750 (2008).
 41. S. Jimenez *et al.*, Inflammatory Response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL Mouse Model of Alzheimer's Disease: Age-Dependent Switch in the Microglial Phenotype from Alternative to Classic. *J. Neurosci.* **28**, 11650–11661 (2008).
 42. H. Akiyama *et al.*, Inflammation and Alzheimer's disease. *NBA* **21**, 383–421 (2000).
 43. H. K. Eltzschig, P. Carmeliet, Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* **364**, 656–665 (2011).
 44. T. Soucek, R. Cumming, R. Dargusch, P. Maher, D. Schubert, The Regulation of Glucose Metabolism by HIF-1 Mediates a Neuroprotective Response to Amyloid Beta Peptide. *Neuron* **39**, 43–56 (2003).
 45. F. Re *et al.*, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation. *J. Immunol.* **169**,

- 2264–2273 (2002).
46. H. G. Fischer, A. K. Bielinsky, B. Nitzgen, W. Däubener, U. Hadding, Functional dichotomy of mouse microglia developed in vitro: differential effects of macrophage and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on cytokine secretion and antitoxoplasmic activity. *J. Neuroimmunol.* **45**, 193–201 (1993).
 47. H. Braak, E. Braak, Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239–259 (1991).
 48. T. Bolmont *et al.*, Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *Journal of Neuroscience* **28**, 4283–4292 (2008).
 49. H. Cho *et al.*, Microfluidic chemotaxis platform for differentiating the roles of soluble and bound amyloid- β on microglial accumulation. *Sci Rep* **3**, 1823 (2013).
 50. I. Luccarini *et al.*, A β plaque-associated glial reaction as a determinant of apoptotic neuronal death and cortical gliogenesis: A study in APP mutant mice. *Neuroscience Letters* **506**, 94–99 (2012).
 51. J. S. Lewis, J. A. Lee, J. C. Underwood, A. L. Harris, C. E. Lewis, Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 889–900 (1999).
 52. C. Murdoch, M. Muthana, C. E. Lewis, Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J. Immunol.* **175**, 6257–6263 (2005).
 53. R. J. Anand *et al.*, Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1 α -dependent manner. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 1257–1265 (2007).
 54. T. Cramer *et al.*, HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* **112**, 645–657 (2003).
 55. S. C. Cheng *et al.*, mTOR- and HIF-1 -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* **345**, 1250684–1250684 (2014).
 56. G. M. Tannahill *et al.*, Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* **496**, 238–242 (2013).
 57. T. F. Liu, V. T. Vachharajani, B. K. Yoza, C. E. McCall, NAD⁺-dependent Sirtuin 1 and 6 Proteins Coordinate a Switch from Glucose to Fatty Acid Oxidation during the Acute Inflammatory Response. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 25758–25769 (2012).
 58. H. Tang, X. Mao, L. Xie, D. A. Greenberg, K. Jin, Expression level of vascular endothelial growth factor in hippocampus is associated with cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **34**, 1412–1415 (2013).
 59. A. Elorza *et al.*, HIF2 α Acts as an mTORC1 Activator through the Amino Acid Carrier SLC7A5. *Molecular Cell* **48**, 681–691 (2012).

60. A. Serrano-Pozo, T. Gómez-Isla, J. H. Growdon, M. P. Frosch, B. T. Hyman, A Phenotypic Change But Not Proliferation Underlies Glial Responses in Alzheimer Disease. *The American Journal of Pathology* **182**, 2332–2344 (2013).
61. W. J. Streit, H. Braak, Q.-S. Xue, I. Bechmann, Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **118**, 475–485 (2009).
62. W. J. Streit, Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends in Neurosciences* **29**, 506–510 (2006).
63. H. Lassmann *et al.*, Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol* **89**, 35–41 (1995).
64. F. Yang *et al.*, Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology* **152**, 379–389 (1998).

Figure legends

Fig. 1. Hypoxia increases A β plaque deposition. 8 and 14 months old AD mice were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (9% O₂) for 20 days. **(A)** A β ₁₋₄₂ levels were quantified by ELISA in total brain extracts from normoxic and hypoxic 14 months old animals. **(B)** Soluble APP α levels were estimated by western blot in protein extracts from the cortex of normoxic and hypoxic 14 months old AD animals. **(C)** Brain sections from normoxic and hypoxic 14 months animals were stained with Thio-S. Scale bars are 1 mm. **(D)** Thio-S load (left) and plaque density (right) were estimated from brain slices ($n = 8$; 4 animals). **(E)** Size distribution of Thio-S plaque density ($n = 8$; 4 animals). **(F)**, Soluble fibrillar A β was detected by dot blot in soluble cortical extracts from WT and AD normoxic and hypoxic 8 and 14 months old animals (3 – 4 independent samples). ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. no significant differences by Student's t -test. Hp: Hippocampus; Cx: Cortex; 8: 8 months old; 14: 14 months old; N: Normoxia, grey bars; H: Hypoxia, blue bars.

Fig. 2. Hypoxia aggravates A β plaque-associated neurodegeneration. 14 months old AD mice were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (9% O₂) for 20 days. **(A)** Cortical sections counterstained with Thio-S (left panels) and immunostained for ubiquitin (UB/Thio-S, right panels). Scale bars are 100 μ m. Right graph shows the quantification of the percentage of UB load ($n = 8$; 4 animals). **(B)** Cortical sections counterstained with Thio-S (left panels) and immunostained for Phospho-Tau (P-Tau/Thio-S, right panels). Scale bar is 20 μ m. Right graph shows the quantification of the percentage of A β plaque area occupied by P-Tau⁺ neurites ($n = 13 - 18$ plaques from 4 animals). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ by Student's t -test. N: Normoxia, grey bars; H: Hypoxia, blue bars. **(C)** Levels of *Sst* and *Npy* mRNAs were estimated by qRT-PCR (a.u. arbitrary units) in hippocampal extracts from normoxic (N: 21% O₂, grey bars) and hypoxic

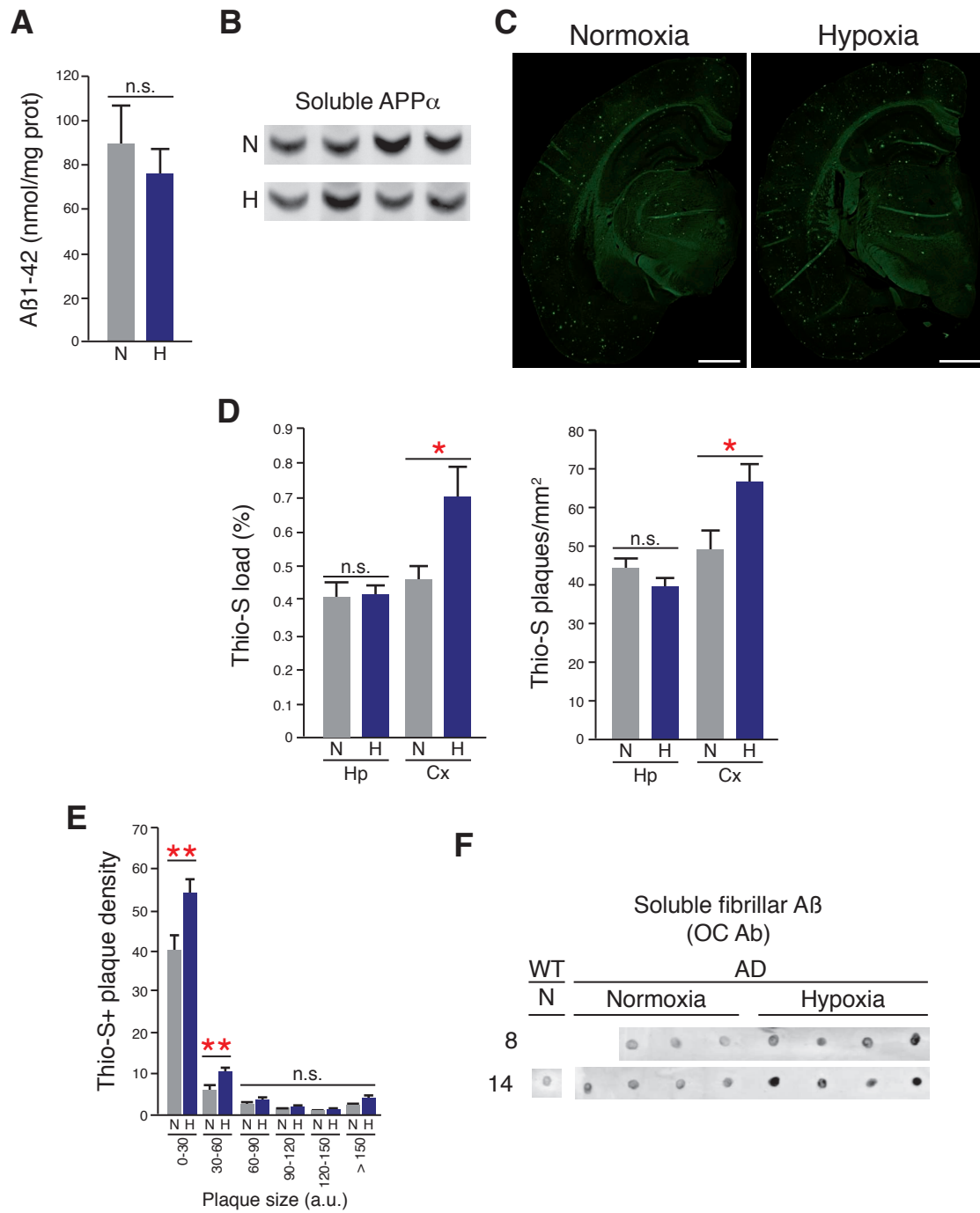
(H: 9% O₂, blue bars) animals. *Gapdh* levels were used as housekeeping control ($n = 4$; * $p < 0.05$ Student's t -test).

Fig. 3. Hypoxia depopulates A β plaques of microglia. 8 and 14 months old AD mice were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (9% O₂) for 20 days. **(A)** Hippocampal brain slices immunostained for IBA1. Scale bars are 100 μ m. The quantification of the number of IBA1+ microglia is shown in the right graph ($n = 4$). **(B)** Upper panels, hippocampal (left) and cortical (right) sections from 14 months old animals stained with IBA1/Thio-S (brown/blue) or Tomato Lectin (TL)/Thio-S (red/green). Scale bars are 200 μ m in IBA1/Thio-S left panels and 20 μ m in high magnification right panels. Scale bars in TL/Thio-S panels are 50 μ m. Lower panels, quantification of the number of IBA1+ microglial cells per A β plaque (left graph; $n = 5 - 7$ plaques per animal, from 4 animals) and the percentage of area of A β plaque occupied by IBA1+ microglia (right graph; $n = 27 - 48$ plaques per animal, from 4 animals). **(C)** Relative levels of *Iba1* mRNA extracted from the hippocampus of 14 months old normoxic (N: 21% O₂, grey bars) and hypoxic (H: 9% O₂, blue bars) animals. *Gapdh* levels were used as housekeeping control ($n = 3 - 4$ animals). **(D)** Representative images of hippocampal (left panels) and cortical (right panels) sections from 14 months old animals immunostained for Ki67 (brown, phase contrast) and IBA1 (red), and counterstained with Thio-S (green). Arrowheads indicate Ki67+ microglia and insets depict the magnification of small dotted squares. Scale bars are 50 μ m in low magnification panels and 25 μ m in the insets. The right graph shows the quantification of the density of Ki67+ ($n = 8$). ** $p < 0.01$; n.s. no significant differences by ANOVA, Tukey's test in **A**, and by Student's t -test in **B - D**. Hp: Hippocampus; Cx: Cortex; 8 m: 8 months old; 14 m: 14 months old; N: Normoxia, grey bars; H: Hypoxia, blue bars.

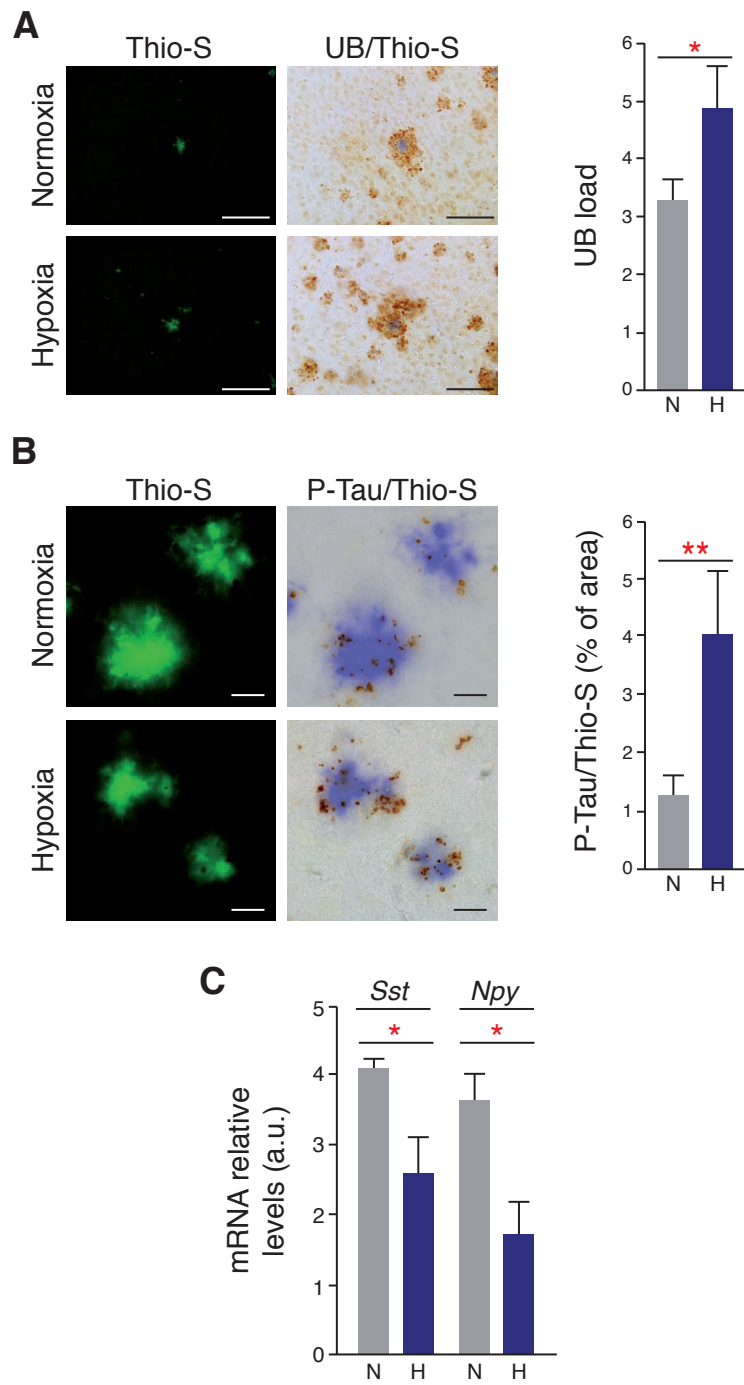
Fig. 4. Hypoxia induces microglia cell cycle arrest through HIF. (A) Cell cycle analysis using propidium iodide (PI) staining of BV2 cells exposed to normoxia (N: 21% O₂, 48 h, left panel), hypoxia (H: 1% O₂, 48 h, middle panel), or reoxygenation (R: 24 h H and 24 h N, right panel). G0/G1 phase is depicted in dark blue, S phase in blue, and G2 phase in light blue. The quantification of the percentage of cells found in the different cell cycle phases is shown in the right graph ($n = 3$). (B) Representative images of proliferation in primary microglia cultures. Cultures were exposed to either normoxia (N: 21% O₂, 24 h, left panels) or hypoxia (H: 1% O₂, 24 h, right panels) and incubated with 10 μ M bromodeoxyuridine (BrdU) during the last three hours. BrdU incorporation is shown in green, IBA1 in red, and nuclei in blue (DAPI). Insets show a magnification of the small dotted squares. White arrowheads indicate BrdU+ microglia nuclei and green arrowhead a BrdU+/IBA1- cell. Scale bars are 100 μ m and 25 μ m in the insets. The quantification of the nuclear BrdU incorporation in microglia cells is shown in the right graph ($n = 4$). ** $p < 0.01$ Student's t -test. (C) Primary microglial cultures from *Cx3cr1-Cre::ERT2-Hif^{Flox/Flox}* mice were either treated with vehicle (C) or tamoxifen (TMX; 100 nM) and the effect on HIF1 α expression was assayed either by qRT-PCR (left panel) and by western blot (middle panel) in normoxia (N) and after DMOG (D; 1 mM, 24 h) treatment. Primary cultures of microglia treated with vehicle (C) or TMX were manipulated as in B and the number of BrdU positive microglial cells was estimated and presented as the percentage of normoxia (right panel). ** $p < 0.01$ by Student's t -test.

Fig. 5. AD brains exhibit molecular markers of hypoxia. (A) Microglia primary cultures were chronically exposed to control, M-CSF, or GM-CSF treatment (20 days), and to normoxia (N: 21% O₂) or hypoxia (H: 1% O₂) for 6 h. Representative images of HIF1 α levels were obtained by western blot. β -actin (β -act) was used as a loading control. Western blot quantification of

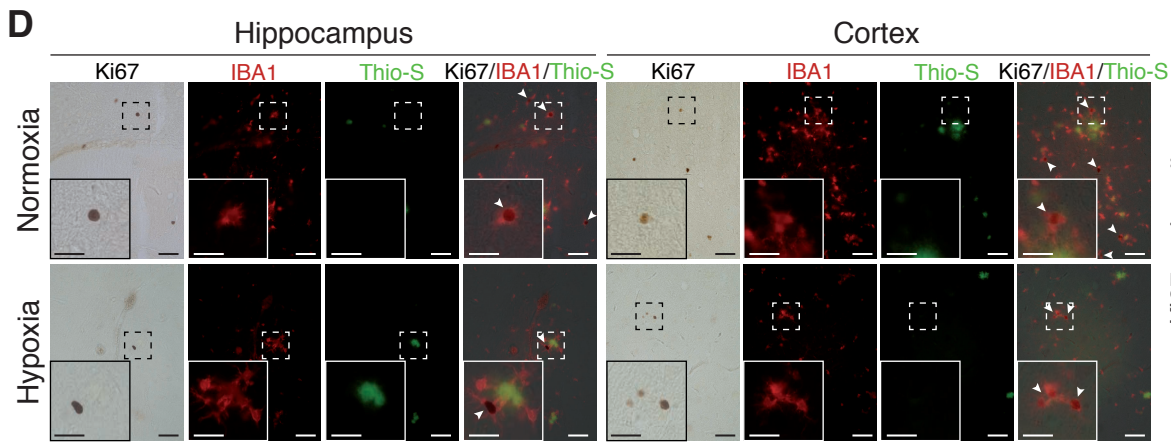
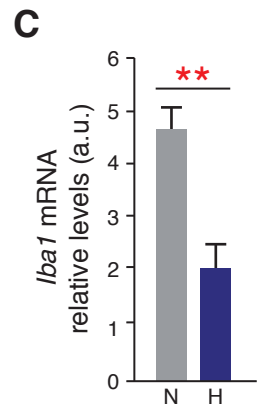
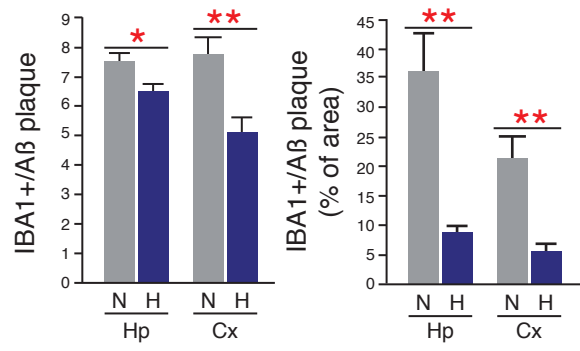
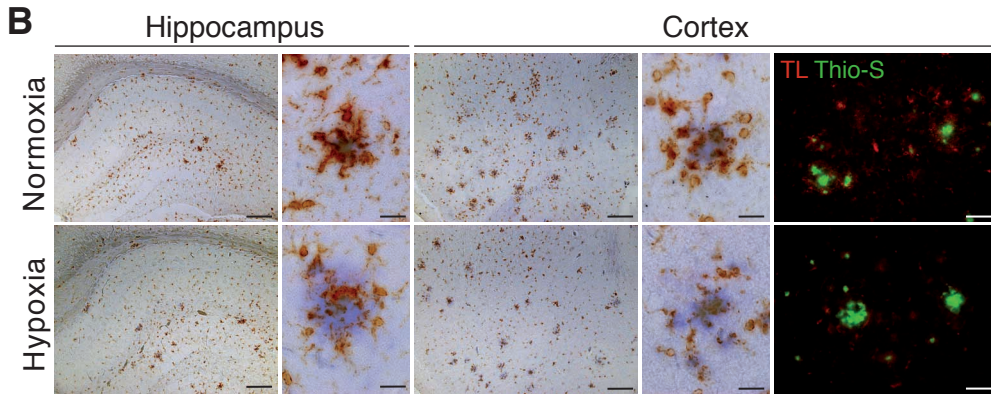
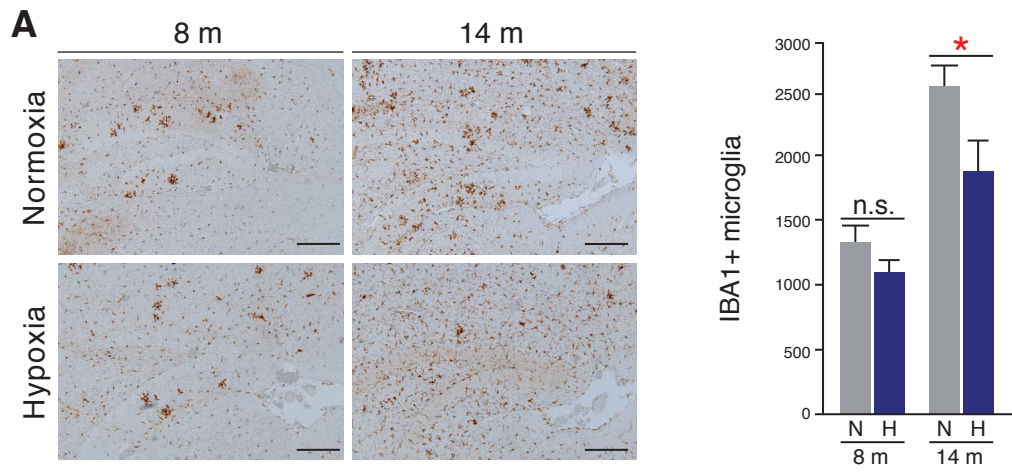
HIF1 α / β -actin protein levels is shown in the right graph ($n = 4$; Univariate analysis of variance (UAV), cytokines/oxygen interaction: $F = 3.874$, $p = 0.04$). **(B)** *Phd2* (left panel) and *Hif1 α* (right panel) mRNA levels were estimated by qRT-PCR in cells treated as in **A**. ($n = 8$; UAV, cytokines/oxygen interaction: *Phd2*, $F = 11.21$, $p = 0.000$; *Hif1 α* , cytokines: $F = 55.461$, $p = 0.000$, ## $p < 0.01$ by Bonferroni's test). Asterisks represent significant differences between normoxia and hypoxia (** $p < 0.01$; n.s. no significant differences by Student's t -test). **(C)** HIF1 α levels were quantified by western blot in protein extracts from human hippocampus. Samples from control (C) and Braak and Braak stages II (ADII), III-IV (ADII-IV), and V-VI (ADV-VI) subjects were used. β -actin (β -act) was used as a loading control. A protein extract from HeLa cells exposed to hypoxia (H: 1% O₂, 4 h) was used as a positive control to identify HIF1 α molecular weight (right line). The right graph shows the quantification of HIF1 α / β -act levels. **(D)** *Vegfa* (left panel) and *Slc7a5* (right panel) mRNA levels were estimated by qRT-PCR in extracts from human hippocampus (see **C**). Blue dots represent individual values and light blue dots values that have been considered as outliers ($n = 35$ AD/control samples; Kruskal-Wallis's test; $F = 15.78$; $p = 0.001$ for HIF1 α ; $F = 8.023$; $p = 0.045$ for *Vegfa*; and $F = 8.235$; $p = 0.041$ for *Slc7a5*).



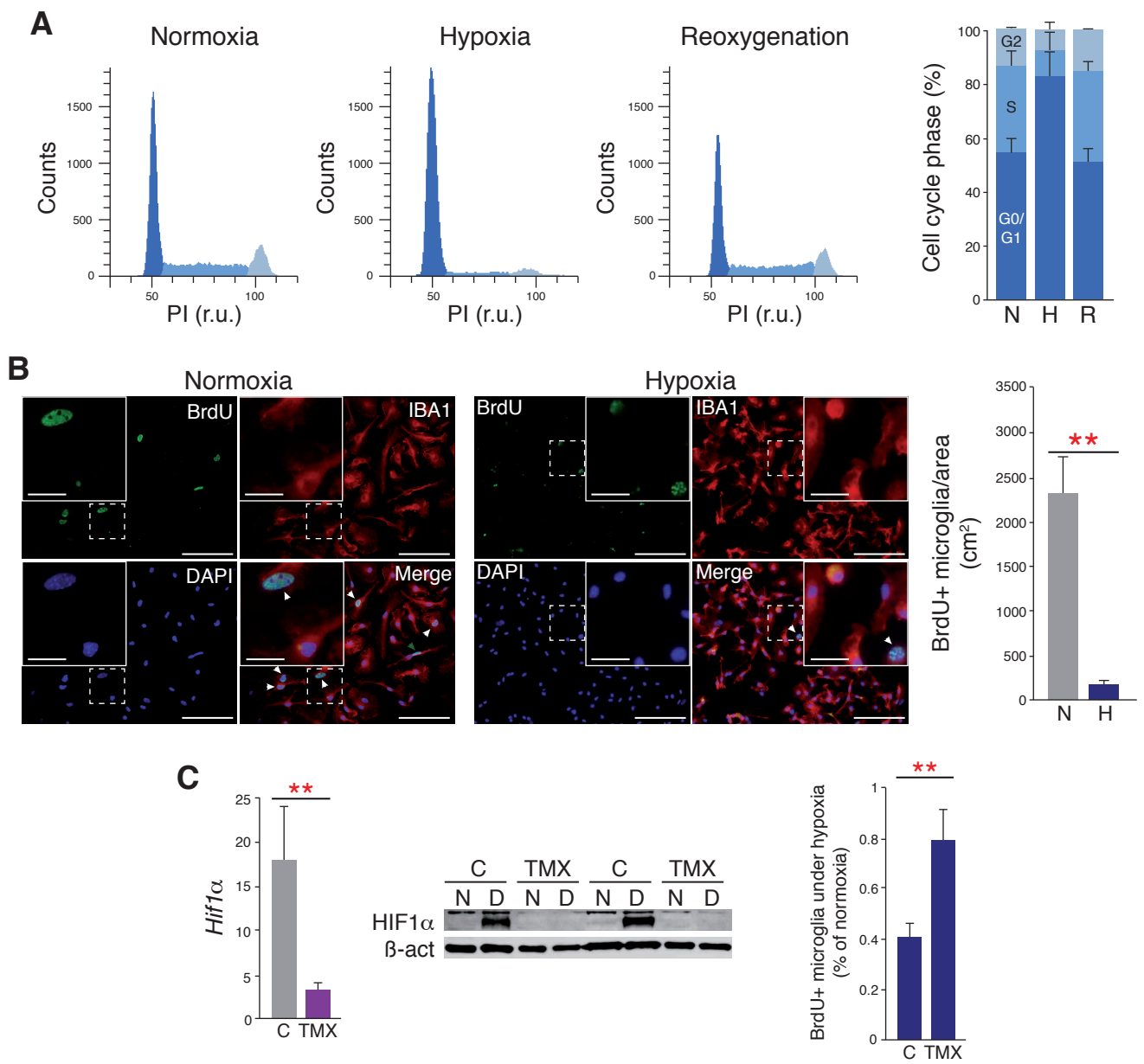
Heras-Garvin *et al.*, Figure 1



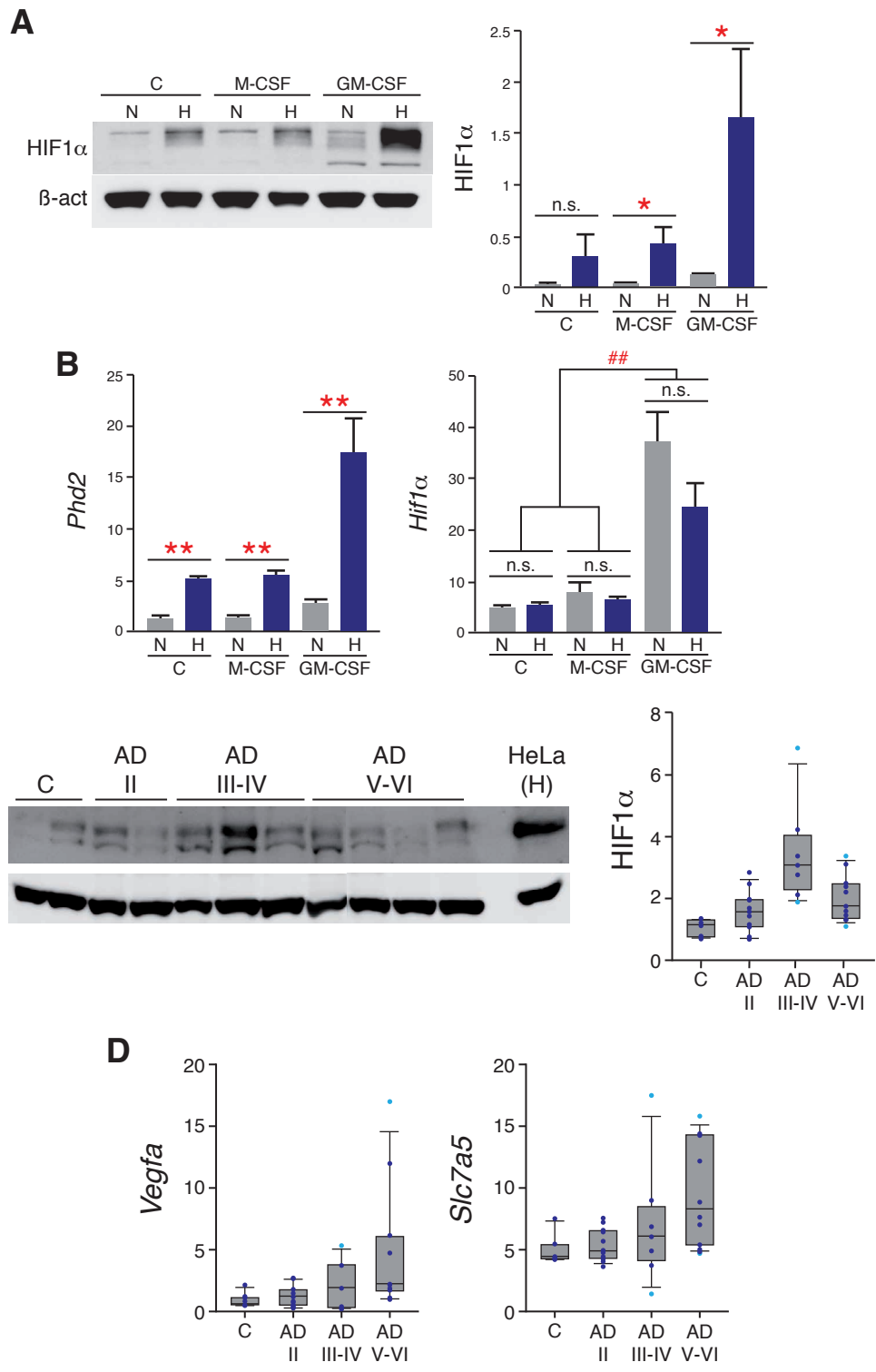
Heras-Garvin *et al.*, Figure 2



Heras-Garvin *et al.*, Figure 3



Heras-Garvin *et al.*, Figure 4



Heras-Garvin *et al.*, Figure 5

Supplementary Materials for

Hypoxia aggravates Alzheimer's disease *via* HIF-mediated microglial dysfunction

Antonio Heras-Garvin, Rosana March-Diaz, Adrian Viehweger, Sebastian Jimenez,

Victoria Navarro, Nieves Lara-Ureña, Almudena Gerpe, Emma J. Hodson, Marisa

Vizuete, Antonia Gutierrez, Peter J. Ratcliffe, Tammie Bishop, Jose Lopez-Barneo,

Eduarne Berra, Alberto Serrano-Pozo, Javier Vitorica, and Alberto Pascual

Materials and Methods

Experimental models

BV2 cell line

The transformed microglial cell line was obtained from the Interlab Cell Line Collection (National Institute for Cancer Research and Advanced Biotechnology Center, Italy). Cells were grown in RPMI 1640 medium (PAA) supplemented with 10% FBS (Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco) and maintained under a water-saturated atmosphere of 5% CO₂ and 5% air. Cell detachment was performed by trypsinisation with 0.25% trypsin-EDTA (Gibco). In all experiments, cells were plated at 30%–50% confluence to prevent the activation of microglial cells and the development of anaerobic conditions.

Primary cultures of microglia and astrocytes

Primary microglia (1) and astrocyte (2) cultures were prepared as previously described from brains of 1-3 days old wild-type (WT; CD-1) mice. Briefly, for primary microglia cultures, meninges were removed from the brains and the brain tissue was triturated and trypsinised in 1x Trypsin-EDTA (PAA). Dissociated cells were cultured in DMEM-Ham's F12 supplemented with 10% FBS (Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Gibco) and 0.1 mM non-essential amino-acids (Gibco) in poly-D-lysine-coated plates (Nunc). The cultures were maintained at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ and 5% air for 20 days. The medium was changed every 3-4 days. Isolation of microglial cells was performed by mild trypsinisation with 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco) diluted 1:3 in serum free medium for 30-45 min. The detached cells were discarded. Recombination efficiency was assayed by western blot against HIF1 α and qRT-PCR. For primary astrocyte cultures, meninges were removed and the brains were

incubated in 2 mg/mL of papain (Worthington) and triturated in Hibernate-E containing 2% B27 and 0.5 mM Gmax (Gibco). Dissociated cells were cultured in Neurobasal medium (Gibco) containing 2.5 mM Gmax and 10% FBS at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ and 5% air for 7-10 days until the culture became confluent.

Animals

C57BL/6N, *APP^{swe};PSEN1 Δ , Egln1, Egln2, Egln3, Cxcr1-Cre::ERT2, Hif1 α ^{Flox/Flox}* and CD-1 mice were housed under temperature (22 °C) and humidity controlled conditions in a 12 h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water. Housing and treatments were performed according to the animal care guidelines of European Community Council (86/60/EEC). The Animal Research Committee at the Hospital Universitario Virgen del Rocio approved all procedures. Heterozygous B6.Cg-Tg(*APP^{swe};PSEN1 Δ E*)85Dbo/J mice (AD mice) were obtained from Jackson Laboratory (stock number 005864) and genotyped according to the described protocol. *Egln1*, *Egln2*, and *Egln3* mice are as described in (3) and (4). Control WT littermates were obtained either by crossing AD with C57/B6J mice or by crossing *Egln^{+/-}* animals to produce WT and homozygous (*Egln1* and *Egln3*) or heterozygous (*Egln2*). *Cxcr1-Cre::ERT2* mice (5) were obtained from EMMA. *Hif1 α ^{Flox/Flox}* animals (6) were obtained from Jackson Laboratories. *Cxcr1-Cre::ERT2; Hif1 α ^{Flox/Flox}* mice were obtained by crossing the previous two genotypes. Experimental groups were homogeneously distributed by sex. Animals were euthanized by administration of a lethal dose of anesthesia (sodium thiopental, thiobarbital).

Human brain samples. Human tissue was kindly provided by Dr Alberto Rábano Gutiérrez Arroyo, director of the *Banco de Tejidos para Investigación Neurológica*

(Madrid, Spain) and Dr Isidro Ferrer coordinator of the *Banco de Tejidos Neurológicos of the Servicio de Anatomía Patológica IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge* (Barcelona, Spain). Thirty-five post-mortem specimens were used: 6 young controls (average age 47.8 ± 5.8 y; average post-mortem interval (PMI): 7.5 ± 3.8 h), 11 ADII (average age 77.3 ± 7.4 y; average PMI: 7.4 ± 5.1 h), 7 ADIII-IV (average age 74.3 ± 13 y; average PMI: 6 ± 5 h), and 11 ADV-VI (average age 80.7 ± 10.6 y; average PMI: 10.8 ± 5 h). All material was dissected from the same level of the hippocampus and was quick frozen after removal. All AD cases were matched pairwise for age, sex, and PMI.

Treatments

In vivo hypoxia treatment. Mice (4 – 14 months old) were chronically exposed to a 9% O₂ environment by using a specially designed hermetic chamber with O₂ and CO₂ controllers and temperature and humidity monitoring (Coy Laboratory Products, Inc., Grass Lake, MI). CO₂ and humidity were eliminated by filtering the air through sodasorb (Grace) and silica gel (Panreac) using a pump connected with the humidity and CO₂ controllers (7, 8). Access into the chamber for animal feeding and cage cleaning occurred through an air lock leaving the conditions in the chamber unaffected. Light, feeding, and cleaning cycles were kept uniform for all groups. Normoxic mice (controls) were also exposed to the same chamber but under a 21% O₂ environment.

In cellulo hypoxia treatment. Hypoxic conditions (1% O₂, 4% N₂, and 5% CO₂) were achieved in a humidified variable aerobic workstation (Invivo2 300; Ruskin). Before experimentation, media were pre-equilibrated overnight to the experimental oxygen level.

M-CSF and GM-CSF treatment. Primary microglia cultures were grown in the presence of 5 ng/mL of M-CSF (PerproTech) or 10 ng/mL of GM-CSF (PerproTech). After isolation, cells were cultured in normoxia (21% O₂) or hypoxia (1% O₂) conditions for 6 h.

Tamoxifen (TMX) treatment. Primary microglia cultures were treated with 100 nM TMX for 6 days prior to trypsinization.

Quantitative RT-PCR

Levels of different mRNAs were determined by qRT-PCR. RNA was extracted from primary microglia or astrocyte cultures using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA extraction from hippocampus or whole brains of AD or WT mice was conducted in a homogenizer (Omni TH) in the presence of TRIzol (Invitrogen). RNA samples (0.5 µg) were treated with RNase-free DNase (GE Healthcare) and copied to cDNA using SuperScriptII reverse transcriptase (Invitrogen) in a final volume of 20 µL. Real time PCR was performed in an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied-Biosystems) using either SYBR-Green or TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied-Biosystems). *18S*, *Hmbs*, and *Gapdh* RNA levels were estimated to normalize for RNA input amounts. Primers and TaqMan sequences are available upon request.

Western blot

For primary cultures, total proteins were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Samples were resuspended in lysis buffer 1, pH 8.5 [30 mM Tris-HCl, 2 M thiourea, 7 M urea, 4% (w/v) CHAPS] and quantified using the RC-DC protein assay kit (Biorad).

Soluble extracts from AD or WT animals were prepared by homogenization of

brain cortices using a dounce grinder in a volume corresponding to 10x wet weight of PBS containing protease inhibitor cocktail (Roche, 1:1,000), phosphatase inhibitor (Sigma, 1:100) and 2 mM 1,10-Phenanthroline. The homogenates were centrifuged 5 min at 600 g at 4°C to discard not disrupted cells and big organelles. The supernatants were centrifuged 1 h at 100,000 g at 4°C to discard membrane-associated proteins using an Optima-Max ultracentrifuge (Beckman-Coulter). The soluble fractions obtained were stored at -80°C until use. Proteins were quantified using the RC-DC protein assay kit (Biorad).

Total proteins were obtained from frozen human hippocampal tissue after sequential RNA and DNA extraction using Tripure™ Isolation Reagent (Roche), according to the manufacturer's instructions. Protein pellets were solubilized using 4% (w/v) SDS, 8 M urea, 40 mM Tris-HCl, pH 7.4. Pellets were rotated overnight at room temperature and quantified by Lowry assay.

Western Blot was performed using standard procedures. Antibodies used were anti-HIF1 α (Cayman, 1:100), anti- β -actin (Sigma, 1:5,000), and anti-APP α (IBL, 1:500). Detection of signal was performed using HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Sigma, 1:1,000 & GE Healthcare, 1:1,000 respectively) and Immun-Star™ WesternC™ Chemiluminescence Kit (Bio-Rad).

Dot Blot

Soluble cortical extracts of AD or WT mice were prepared as described in the western blotting section. 1 μ g of each soluble extract was spotted onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare) and air-dried for 30 min. The membrane was incubated overnight at 4°C in 1x PBS-Tween 0.1% with the primary antibody OC (Millipore, 1:5,000). Incubation with secondary antibody, and detection of signal were performed as in western blot.

A β ₁₋₄₂ ELISA

For ELISA sample preparation, 8.2 M guanidine HCl/50 mM Tris-HCl solution was added to a final molarity of 5 M per brain hemisphere, disrupted, and incubated 4h at room temperature with mixing. After incubation, the sample was stored at -20°C until further use. Thawed ELISA samples in guanidine 5M were diluted 1:50 in reaction buffer (BSAT-DPBS). This dilution factor was determined prior to experiments. The samples were incubated for 4 h at room temperature with casual mixing and stored at -20°C until use. Thawed samples were diluted 1:50 in reaction buffer (BSAT-DPBS plus protease inhibitor, Invitrogen, 1:1,000). After a centrifugation step at 16,000 g for 20 min at 4°C, the supernatant was carefully decanted and stored on ice until used for the assay. For standard curve samples, lyophilized A β ₁₋₄₂ synthetic peptide (Anaspec) was used.

Cell cycle

BV2 cells were exposed to normoxia, hypoxia or reoxygenation (24 h in hypoxia followed by 24 h in normoxia). After treatments, 1×10^6 cells were harvested, washed with PBS, and resuspended in 5 mL of ice-cold 70% ethanol. Cells were fixed at 4°C overnight and resuspended in 700 μ L of FACS/EDTA [2 mg/mL BSA, 10 mM HEPES, 88% (v/v) L15 medium (Gibco), 0.1% penicillin/streptomycin (Gibco) and 5 mM EDTA]. After incubation at room temperature for 15 min, cells were washed twice with 500 μ L of FACS/EDTA and finally resuspended in 800 μ L of the same buffer supplemented with 0.2 mg/mL of RNase A (Qiagen). Samples were incubated at 37°C in agitation for 1 h. 30 min before the flow-cytometric analysis, 0.04 mg/mL of propidium iodide (Calbiochem) was added and the samples were incubated at 4°C for 15 min in the dark. Finally, cells were resuspended in 500 μ L of FACS/EDTA. Flow cytometry was performed in a BD

LSRFortessa™ and cell cycle distribution was analyzed using BD FACSDiva™ software.

A β oligomerization

Synthetic lyophilized A β ₁₋₄₂ peptide (Anaspec) was resuspended in hexafluoro-2-propanol (HFIP) to a final concentration of 1 mM and incubated at 4°C for 1 h in a rotating microtube mixer. HFIP was evaporated using a speed vacuum for 30 min and the dried peptides were stored at -80 °C. Before use, peptides were resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO) to a final concentration of 5 mM for 15 min at room temperature. To form the oligomeric A β (ADDLs) (9), the 5 mM stock was diluted in cold PBS to a final concentration of 100 μ M. The microtube was agitated for 30 sec and incubated overnight at 4°C in a rotating microtube mixer.

Migration assays

BV2. Oligomeric A β was added to BV2 cells growing in 24-well plates to a final concentration of 10 μ M. Cells were incubated in normoxic or hypoxic conditions and, after 24 h, phase contrast images were taken using IX-71 microscope (Olympus) at 40x magnification.

Primary culture. Chemotactic ability was assessed using Boyden chamber assay. After 24 h of microglia isolation, cells were trypsinized in 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco) for 5 min, centrifuged 5 min at 300 g and resuspended in microglia conditioned medium. 10,000 cells per well were seeded onto the upper chamber of a transwell containing inserts with polycarbonate filters of 8 μ m pore size (Transwell Costar 3422, Corning Life Sciences). Microglia conditioned medium with or without 1 μ M of oligomeric A β (Anaspec) or 100 μ M ATP (Sigma) was added to the lower chamber, and transwells were incubated in normoxia or hypoxia conditions. 24 h later, cells on the upper compartments were scrapped,

the inserts were washed with PBS, and cells were fixed with methanol for 10 min at -20°C. Cells were stained with 0.1% crystal violet (Sigma) in 20% methanol for 20 min at room temperature. Finally the inserts were washed 3 times with distilled water and air-dried overnight. Cells on the lower face of the filter were photographed by phase-contrast microscopy using an IX-71 microscope (Olympus).

Immunodetection

Primary cultures. Immunostaining of microglia and astrocyte cultures plated on coverslips were performed after fixation with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min, followed by 3 washes with PBS. Permeabilization was done by incubation of cells in 0.5% PBT (PBS, 0.5% Triton X-100) for 15 min. After 3 washes in 0.1% PBT, cells were blocked with blocking solution [10% Goat serum (Gibco), 1 mg/mL BSA, 0.1% PBT] for 1 h. Incubation of primary antibodies was done overnight at 4°C in blocking solution. To stain microglial cells we used anti-IBA1 (Wako, 1:400), and for astrocytes anti-GFAP (Sigma, 1:2000). After three washes in 0.1% PBT, sections were incubated for 2 h with secondary species-specific antibody [goat-anti rabbit Alexa568 and goat-anti mouse Alexa488 secondary antibody (Invitrogen, 1:800)] in the dark, followed by 5 washes with 0.1% PBT, doing the third in the presence of DAPI (Sigma, 1:1000). Finally, coverslips were mounted using Fluoromount (Sigma) and air-dried at room temperature. Fluorescence was visualized and photographed with a BX-61 microscope (Olympus).

For BrdU staining, the day after microglia isolation, cultures were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (1% O₂) for 24 h, and the last 3 h were incubated in a media containing 10 µM BrdU (Sigma). Cells were fixed with ice-cold 4%

paraformaldehyde for 10 min and permeabilized with ice-cold 70% ethanol at 4°C overnight. Next day, samples were treated with 2 M HCl for 15 min to denature the DNA followed by incubation with 0.1 M sodium borate pH 6.8 for 15 min to neutralize HCl. After this, we used the standard protocol described above, using an anti-BrdU primary antibody (Abcam, 1:250).

Animals. The brain was removed from anesthetized mice and immediately fixed overnight (15 h) at 4 °C with 4% paraformaldehyde in PBS. Brain was paraffin-embedded using an automatic tissue processor (ASP300S, Leica) and paraffin blocks cut in 20 µm thick coronal sections using a microtome (RM2255, Leica). The Envision+ kit (DAKO) was used for chromatic immunohistochemistry according to the recommended manufacturer's protocol. Primary antibodies used were: anti-IBA1 (Wako, 1:500), anti-GFAP (Sigma, 1:1000), anti-GS (Millipore, 1:1000), anti-UB (DAKO, 1:400), anti-NeuN (Millipore, 1:200), anti-Ki67 (BD, 1:200), cleaved caspase-3 (Asp175) (Cell Signaling, 1:250), and anti-P-Tau (Pierce, 1:500). Secondary antibodies were added in a second step and the reaction was developed with 3,3-diaminobenzidine (DAKO). For immunofluorescent studies we used secondary antibodies anti-mouse or anti-rabbit conjugated with Alexa-488 or Alexa-568 (Molecular Probes, 1:800). Tomato lectin staining (Vector, 1:400) was performed incubating sections at 37°C for 1 hour, followed by incubation with Cy3-conjugated streptavidin (Jackson, 1:500). Thioflavin-S, Prussian blue, and hematoxylin staining were used as counterstains according to standard procedures. Images were acquired with a BX-61 microscope (Olympus) and superimages were generated with the newCAST system (Visiopharm) associated with the microscope.

Immunocyto/histochemistry quantitative measurements

Immunocytochemistry. All the measurements were performed blind to the treatment. Coverslips containing primary microglial cells and stained with IBA1/BrdU/DAPI were photographed in full using the newCAST system. Full coverage rather than sampling was chosen for quantification. Cells positive for the three markers were manually counted.

Immunohistochemistry. All the measurements were performed blind to the treatment. Neuroanatomy was assessed using a Mouse Brain Atlas (Paxinos), the hippocampus and the cortex were selected at two specific bregma points from 4 independent animals to estimate Thio-S/UB load, microglia cell number surrounding plaques, plaque coverage by IBA1 and P-Tau staining, and number of Ki67+ microglial cells. A superimage containing a full hemibrain was generated using the newCAST system and the cortex and hippocampus were fully analyzed (full coverage rather than random sampling). The Thio-S/UB load was estimated using ImageJ (National Institutes of Health). Load was defined as the percentage of total brain region area occupied by Thio-S/UB staining. The number of plaques was normalized to the sampled area. In order to count microglia per plaque, plaques in a sample area were systematically randomized (Thio-S staining), and microglia around them counted based in IBA1 labeling plus hematoxylin counterstainings. Then, the plaques were separately analyzed for their area using ImageJ. To estimate the percentage of Thio-S plaques covered by P-Tau or IBA1, separate sections were stained for each of these markers and counterstained with Thio-S. Plaques were randomly selected by Thio-S staining and the Thio-S, P-Tau or IBA1 area was estimated using ImageJ. Results are presented as percentage of IBA1 or P-Tau area per A β plaque area.

To evaluate the number of microglia we performed an unbiased stereological

approach using an Olympus BX61 microscope and the CAST system with a dissector area of 28,521.3 μm^2 (CAST). The dentate gyrus was chosen as sample area. The sample area was then manually outlined and the total area quantified using CAST software.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.E.M. if fitted to a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov's test). Non-normal distributed data were represented using box-and-whisker diagrams and analyzed with a non-parametric test (Kruskal-Wallis). When samples had a normal distribution, comparisons between two groups were performed with Student's *t*-test (two-tailed) and comparisons between several groups with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's Post Hoc test. Univariate analysis of the variance followed by a Bonferroni's Post Hoc test was used when required. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Analysis software was SPSS (version 21.0.0.0; IBM Inc.).

Figures S1-S8

Fig. S1. Chronic hypoxia increases hematocrit appropriately. Hematocrit levels in animals exposed to either normoxia (N: 21% O₂, grey bar) or hypoxia (H: 9% O₂, blue bar) for 20 days. Data are presented as mean \pm S.E.M. ($n = 3 - 7$ animals per group). Asterisks represent significant differences with normoxia. ** $p < 0.01$ (Univariate analysis of variance. Oxygen/Age: $F = 1.54$, $p = 0.226$; Oxygen/Genotype: $F = 0.63$, $p = 0.336$; Genotype/Age: $F = 2.135$, $p = 0.156$; Oxygen/Genotype/Age: $F = 0.04$, $p = 0.827$; Oxygen: $F = 283.06$, $p = 0.000$).

Fig. S2. Hypoxia does not modify transcription of A β related enzymes. Relative levels of the mRNAs encoding for APP and several enzymes involved in synthesis or degradation of A β estimated in brain extracts of 4 months old mice. *Vegfa* gene was used as a hypoxia inducible gene control. Groups are as follow: 1 Normoxia, 16 h; 2 Hypoxia, 16 h; 3 Hypoxia, 16 h-Reoxygenation, 24 h; 4 Normoxia, 30 d; 5 Hypoxia, 30 d; and 6 Hypoxia, 30 d-Reoxygenation, 24 h. *18S* mRNA levels were used as housekeeping control ($n = 4$). Asterisks represent significant differences with normoxia (21% O₂). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ ANOVA, Tukey's test. Number signs represent significant differences with hypoxia (9% O₂). ## $p < 0.01$ ANOVA, Tukey's test.

Fig. S3. Absence of strong neuronal affectation after chronic hypoxia. Brain slices stained with an anti-NeuN antibody. 14 months old AD animals were exposed to normoxia (21% O₂, left panels) or hypoxia (9% O₂, right panels) for 20 days.

Fig. S4. Microglia number is not significantly changed by hypoxia in wild type animals. Hippocampal brain slices stained with an anti-IBA1 antibody (left panel). 8 and 14 months old WT animals were exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia

(9% O₂) for 20 days. Scale bars are 100 μm. Right graph shows the quantification of the number of IBA1+ microglia. Normoxia (N: 21% O₂, grey bars) and hypoxia (H: 9% O₂, blue bars). 8 m: 8 months old; 14 m: 14 months old. *n* = 4, from at least 4 animals; n.s. no significant differences by ANOVA, Tukey's test.

Fig. S5. Astrocytes are not affected by chronic hypoxia. (A) A cortical Aβ dense-core plaque stained with Thio-S (green) surrounded by GFAP+ reactive astrocytes (red). Scales bar are 20 μm. Graphs show the quantification of the ratio of GFAP+ astrocytes far from plaques (> 20 μm) per total astrocytes (GS+ astrocytes; left graph) and the ratio of GFAP+ astrocytes close to plaques (≤ 20 μm) per total astrocytes (GS+ astrocytes; right graph) (*n* = 3 – 4 per group; n.s. no significant differences by ANOVA, Tukey's test). (B) Relative levels of *Gfap* mRNA extracted from the hippocampus of 14 months old normoxic (N: 21% O₂, grey bars) and hypoxic (H: 9% O₂, blue bars) animals. *Gapdh* levels were used as housekeeping control (*n* = 3 - 4 animals; ** *p* < 0.01; n.s. no significant differences by Student's *t*-test).

Fig. S6. Primary cultures of microglia and astrocytes. (A) Immunocytochemistry of primary cultures of microglia (left panel) and astrocytes (right panel) using antibodies against IBA1 (red) or GFAP (green), and DAPI staining (blue). Scale bar is 100 μm. (B) mRNA relative levels of microglial (*Cd33*) and astrocytic (*Gfap*) markers estimated by qRT-PCR (a.u. arbitrary units) in microglial (M, red) and astrocyte (A, green) cultures. *Hmbs* levels were used as housekeeping control (*n* = 3 – 4; ** *p* < 0.01 Student's *t*-test).

Fig. S7. PHD2 and PHD3 deficiency promotes microglial dysfunction. Left panels, representative images of microglia primary cultures from wild type (WT) or mutant *Egln2*^{-/-} (PHD1), *Egln1*^{+/-} (PHD2), or *Egln3*^{-/-} (PHD3) mice were

immunostained with IBA1 (red) and GFAP (green), and counterstained with DAPI (blue). Right graphs show the quantification of the percentage of microglial cells present in each mutant (green bars) relative to their control (grey bars). ** $p < 0.01$ by Student's t -test.

Fig. S8. Hypoxia impairs microglial chemotaxis

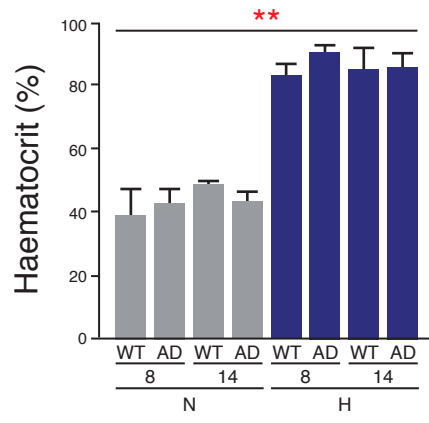
(A), Phase contrast images of BV2 cells chemotaxis towards polymeric A β (arrowheads in left panel). Scale bars are 50 μ m. Quantification of the percentage of total BV2 cells in contact with polymeric A β after 24 h in normoxia or hypoxia (right graph; $n = 25$ images quantified per condition from three independent experiments). (B), Boyden chamber images illustrating the migration of microglial cells in several experimental conditions. Scale bars are 100 μ m. Right graph shows the quantification of the chemotactic index of microglial cells towards A β and ATP after 24 h in normoxia or hypoxia ($n > 6$ transwells from at least three independent experiments, 5 random fields averaged per n). Normoxia (N: 21% O $_2$, grey bars) and hypoxia (H: 1% O $_2$, blue bars). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ Student's t -test.

Fig. S9. Phenotypic differentiation of microglia cultures. Microglia primary cultures were chronically exposed to control, M-CSF, or GM-CSF treatment (20 days), and to normoxia (21% O $_2$) or hypoxia (1% O $_2$) for 6 h. *Tnf* (left panel), *Arg1* (center panel), and *Chil3* (right panel) mRNA levels were estimated by qRT-PCR. ($n = 8$; univariate analysis of variance, cytokines/oxygen interaction: *Tnf*, $F = 0.708$, $p = 0.506$, ## $p < 0.01$ Bonferroni's test; *Arg1*, cytokines: $F = 5.714$, $p = 0.012$; *Chil3*, cytokines/oxygen interaction: $F = 0.175$, $p = 0.841$, ## $p < 0.01$ Bonferroni's test). Asterisks represent significant differences between normoxia and hypoxia and dollar symbol differences between normoxia/control and normoxia/M-CSF (* $p <$

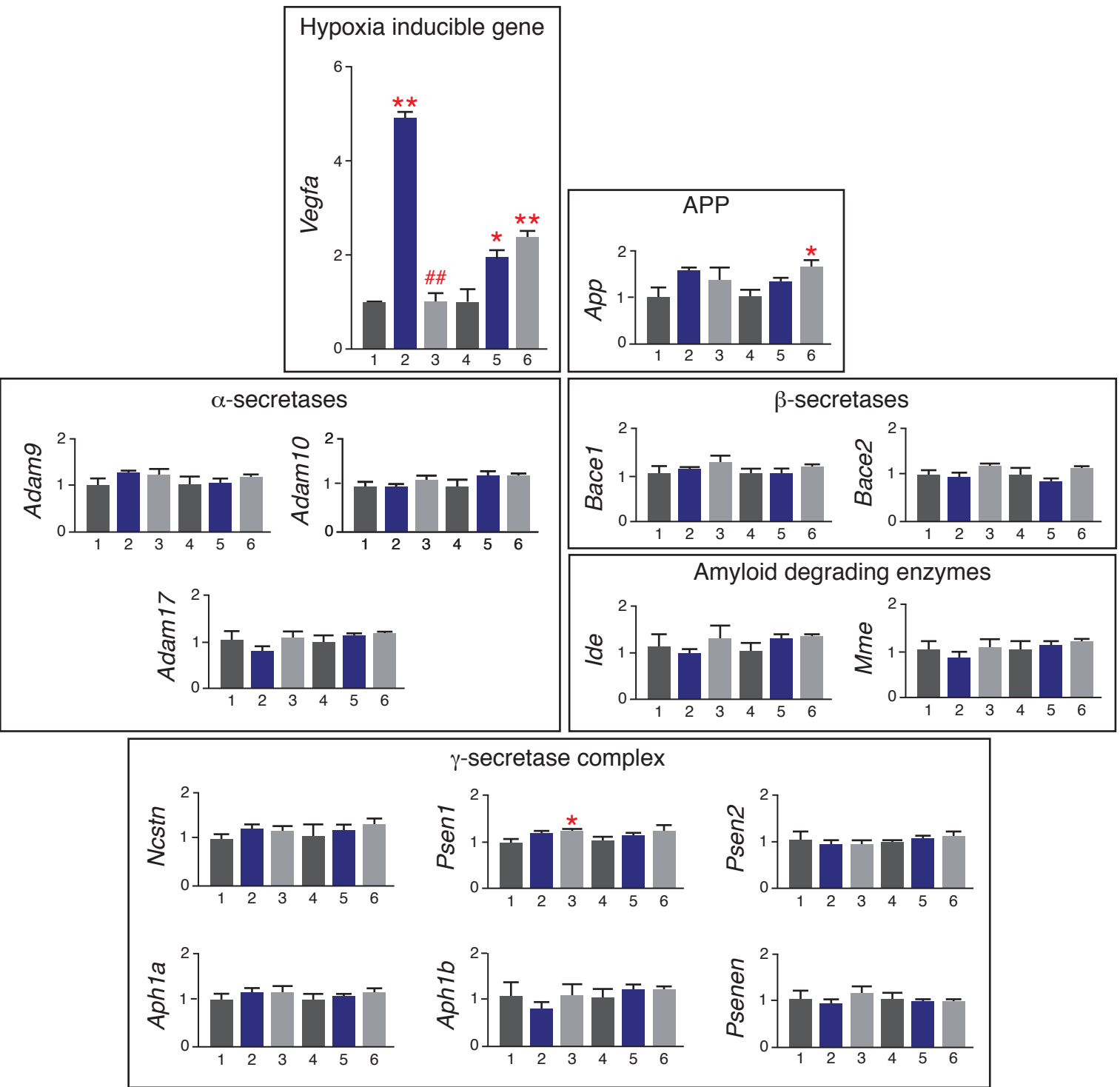
0.05; n.s. no significant differences by Student's *t*-test). N: Normoxia, grey bars; H: Hypoxia, blue bars.

Supplemental references

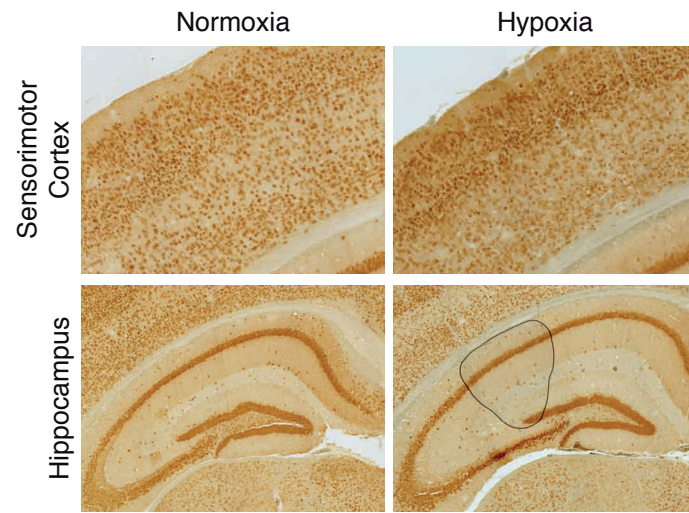
1. J. Saura, J. M. Tusell, J. Serratosa, High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* **44**, 183–189 (2003).
2. G. J. Brewer, J. R. Torricelli, E. K. Evege, P. J. Price, Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* **35**, 567–576 (1993).
3. J. Aragonés *et al.*, Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nature Genetics* **40**, 170–180 (2008).
4. T. Bishop *et al.*, Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3^{-/-} mice. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3386–3400 (2008).
5. S. Yona *et al.*, Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* **38**, 79–91 (2013).
6. H. E. Ryan *et al.*, Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Research* **60**, 4010–4015 (2000).
7. R. Pardal, P. Ortega-Sáenz, R. Durán, J. López-Barneo, Glia-like Stem Cells Sustain Physiologic Neurogenesis in the Adult Mammalian Carotid Body. *Cell* **131**, 364–377 (2007).
8. A. Platero-Luengo *et al.*, An O₂-Sensitive Glomus Cell-Stem Cell Synapse Induces Carotid Body Growth in Chronic Hypoxia. *Cell* **156**, 291–303 (2014).
9. M. P. Lambert *et al.*, Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A β . *J Neurochem* **100**, 23–35 (2007).



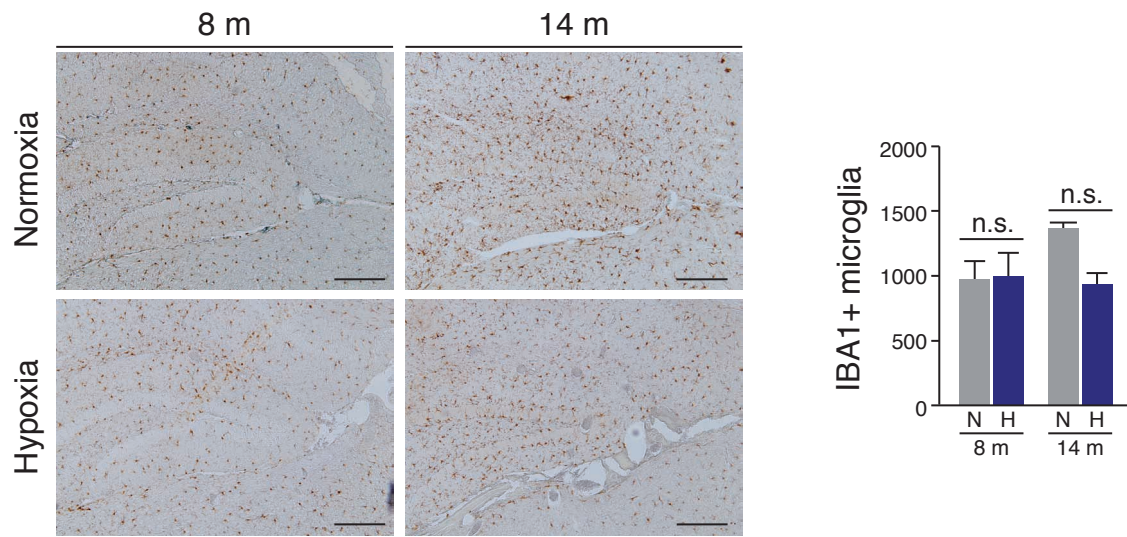
Heras-Garvin *et al.*, Figure S1



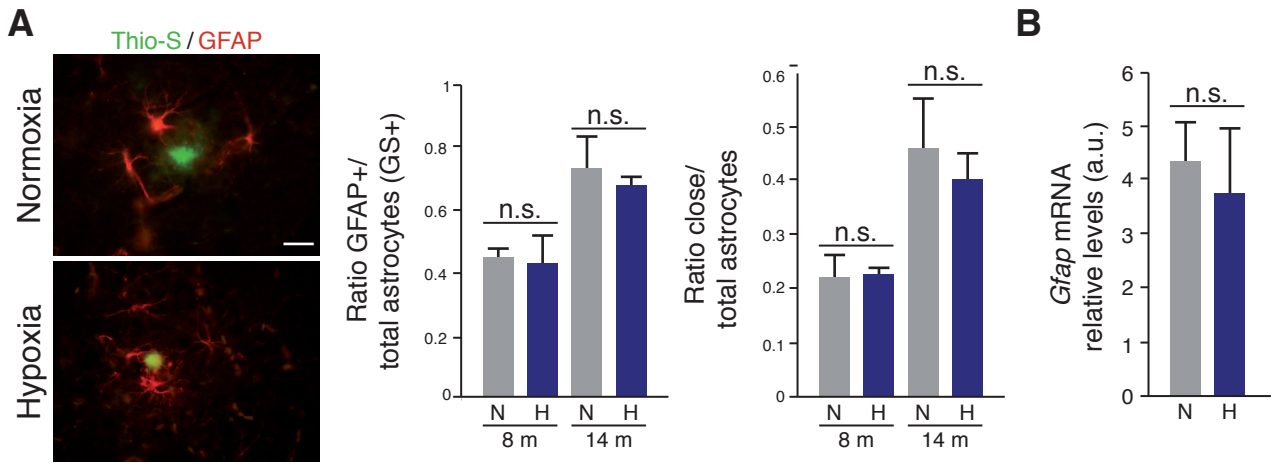
Heras-Garvin *et al.*, Figure S2



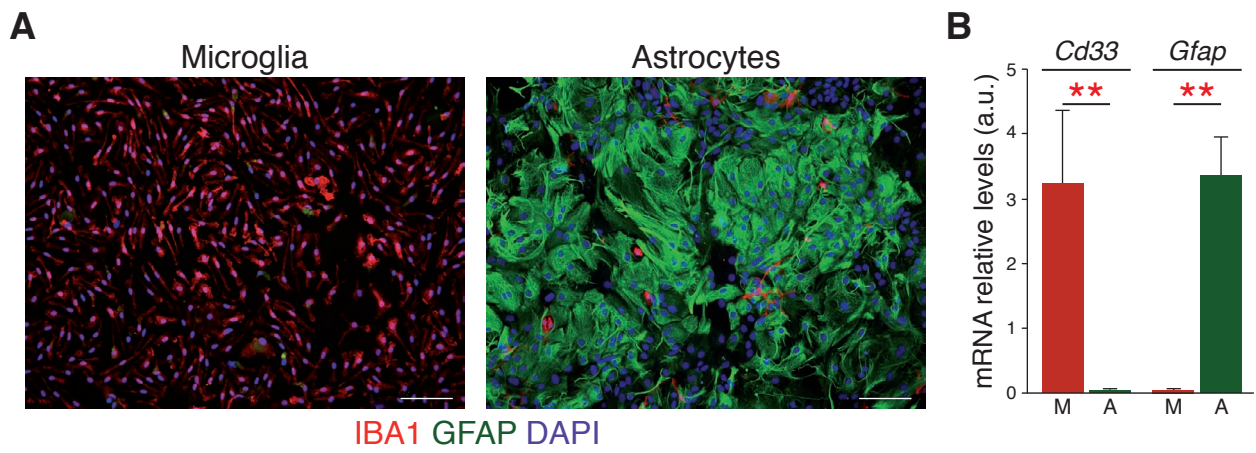
Heras-Garvin *et al.*, Figure S3



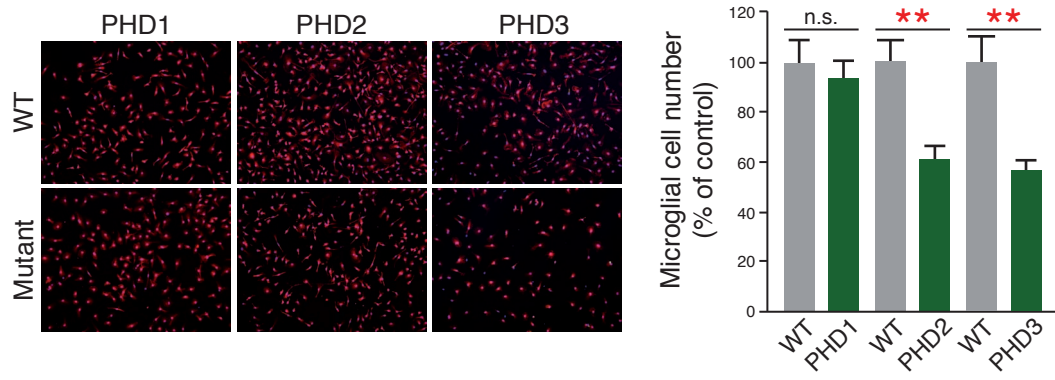
Heras-Garvin *et al.*, Figure S4



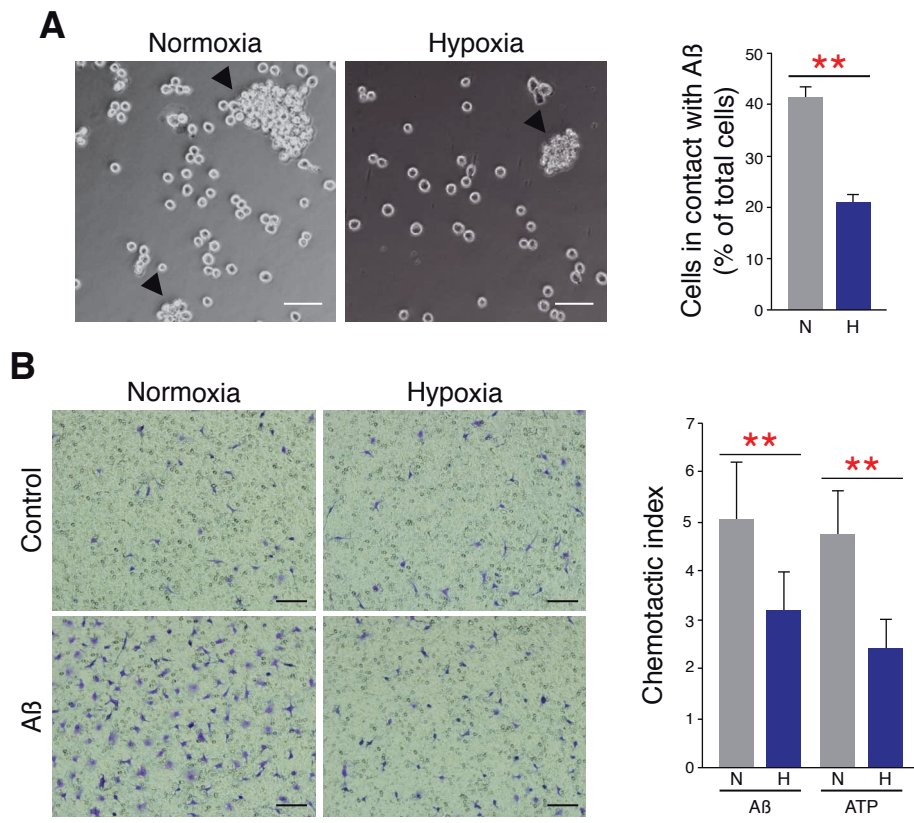
Heras-Garvin *et al.*, Figure S5



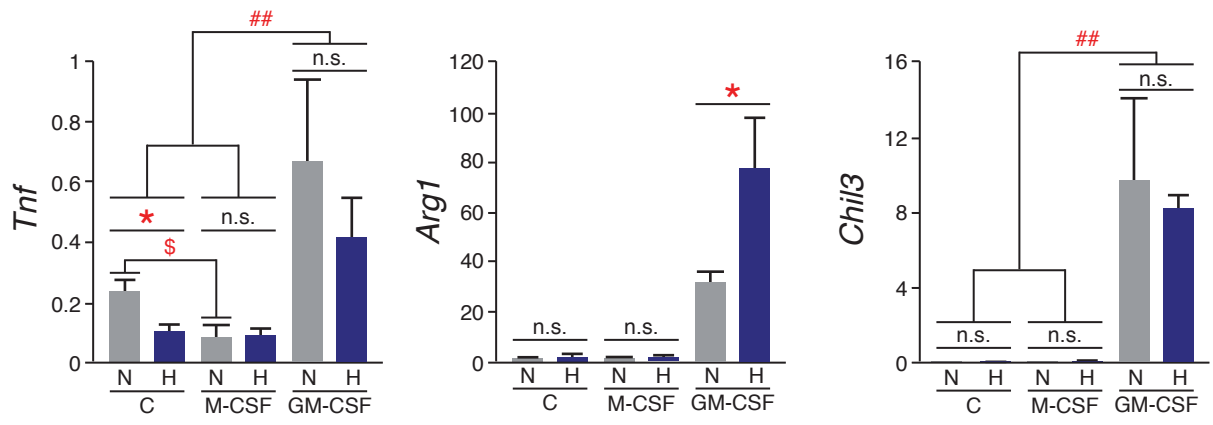
Heras-Garvin *et al.*, Figure S6



Heras-Garvin *et al.*, Figure S7



Heras-Garvin *et al.*, Figure S8



Heras-Garvin *et al.*, Figure S9