



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

---

**LA ESTABILIZACIÓN DE HIF-1 $\alpha$  INDUCE LA  
EXPRESIÓN DE GEFS CLAVES PARA LA ACTIVACIÓN  
DE RAB5**

---

**SOLANGE VERÓNICA RIVAS VERA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Director de Tesis: PhD. VICENTE TORRES GÓMEZ

Laboratorio de Dinámica Celular

**2019**

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO

## INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por la candidata:

*Solange Verónica Rivas Vera*

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctora en Ciencias Biomédicas** en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 29 de enero de 2019.

**Dr. Vicente Torres Gómez**  
**Director de Tesis**  
**Laboratorio de Dinámica Celular**  
**Facultad de Odontología**  
**Universidad de Chile**

### COMISION INFORMANTE DE TESIS

---

**PROF. DRA. LISETTE LEYTON**

---

**PROF. DRA. CARMEN ROMERO**

---

**PROF. DR. MARIO CHIONG**

---

**PROF. DR. CÉSAR CÁRDENAS**

**Presidente Comisión de Examen**

## DEDICATORIA

Esta tesis se realizó gracias a la enseñanza y apoyo de mi Tutor de tesis el Dr. Vicente Torres, quien confió en mi para dilucidar una interrogante importante y poco explorada en el Laboratorio de Dinámica Celular. Todo el trabajo en equipo y crecimiento profesional queda plasmado en esta tesis que necesitó 3 años para culminar. Además, va dedicada también con mucho cariño a todo el equipo del laboratorio que vela por el correcto desarrollo y trabajo en equipo que la ciencia necesita.

Además, de forma personal quiero dedicar esta tesis a la VIDA y al Universo, quienes me han mostrado las oportunidades para estar en el lugar y momento que me corresponde, y por enseñarme a disfrutar del camino más que la misma meta, por enseñar a conocerme y ser feliz conmigo ante las victorias, como también ante los fracasos, porque de ahí emana la verdadera sabiduría y evolución del ser humano.

Una parte muy importante de este gran logro, es gracias a mi Padre Jorge Rivas, quien confió y me apoyó siempre, ya que cuando tenía 20 años, decidí continuar mis estudios en la Ciudad de Santiago y nunca dudó de mis capacidades. Te doy gracias Papá porque no tuve la necesidad de trabajar y pude enfocarme completamente en disfrutar mis estudios, lo cual es un gran privilegio hoy en día. Gracias Papá por tu ejemplo de esfuerzo y por ayudarme a alcanzar mis sueños. Gracias por confiar en mi y transmitirme siempre tu convencimiento de que siempre se puede ir por más de lo que creemos.

Doy enormes gracias a la Vida también por el regalo de ser Tía y le dedico mi tesis también a mi hermoso, noble e inteligente sobrino Thomas y mi dulce, risueña y valiente sobrina Mathilda, quienes me inspiran y desafían a ser mejor persona para enseñar con el ejemplo, transmitiendo la pasión por la vida y los desafíos, y para que sepan que el compromiso, es un factor importante para alcanzar nuestras sueños, para ser feliz en el trayecto y sorprenderse con la meta.

Como olvidar a mi Madre, que me dio siempre tanto amor incondicional y ejemplo de humildad, yo se Mamá que me acompañas día a día, donde sea que estés. Además quiero dar enormes gracias a mis amigas y amigos, mi familia elegida, quienes me aman simplemente por existir, y siempre están apoyándome, amándome y guiándome. Esta tesis finaliza gracias a ustedes Daniela, Denisse, Giannina, Jordan, Hernan, Natalia Ejarque y Natalia Landeros, Constanza Fernández, Claudio Cappelli, Estefanie Dufey. Además, va dedicada a mi mentora y actual Jefa, querida Profe Katherine Marcelain, quien desde mi pregrado me abrió las puertas de su laboratorio y a la ciencia, enriqueciendo mi pensamiento científico y pasión por la ciencia. Ella potenció mi creatividad y desde siempre, me ha apoyado completamente y en todo momento.

Y por supuesto, para finalizar quiero agradecer a María Cecilia Cárter, quien es mucho más que una secretaria del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, ella una mujer preocupada y muy comprometida con su trabajo, además siempre nos ayuda a resolver nuestros problemas, es una tutora que estará siempre para ayudar a resolver, aclarar y mediar cualquier necesidad o preocupación que uno tenga, ella siempre sabe que hacer. Gracias Cecy por tanta dedicación y amor, sin tu labor el Doctorado no sería lo mismo, tu no nos ves como un número más ya que siempre nos has entregado un pedacito de tu corazón a cada uno de nosotros.

Gracias a todos por ser parte de esta hermosa experiencia de vida, por ayudarme a levantar mis brazos cuando pensé que ya no podría y por celebrar cada nueva etapa de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile por confiar en mis conocimientos y en mis ganas de crecer, ya que me abrieron las puertas para postular y posteriormente ser beneficiaria de la Beca de Doctorados Nacionales de Conicyt el año 2014.

También, quiero agradecer al Dr. Martín Montecino por darme la oportunidad de trabajar con su equipo en el Laboratorio “Center of Genome Regulation” y aprender la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), la cual nos otorgó uno de los resultados más precisos para describir un importante fenómeno molecular, el cual postuló y comprobó en esta tesis.

Además, quiero agradecer al Dr. Justin Topp, Científico que actualmente trabaja en Endicott College, Beverly, Massachusetts. Al Dr. Justin lo contacté vía email, con la intención de colaborar mediante la facilitación de plasmidios mutantes para una de las moléculas centrales de esta tesis (los cuales además no existen comercialmente). Los plasmidios se desarrollaron y publicaron por él previamente el año 2006 y Justin amablemente y en breve tiempo concretó la colaboración.

Además, quiero agradecer a cada uno de los Académicos que me nutrieron de conocimiento y pasión por aprender en cada una de las asignaturas cursadas durante el primer año y medio de formación Científica.

Finalmente, quiero agradecer a la oportunidad de participar y presentar mis resultados obtenidos año a año en la Sociedad de Biología Celular de Chile y por tener la oportunidad de conocer científicos destacados a nivel nacional e internacional.

Esta Tesis de Doctorado se realizó en el Laboratorio de Dinámica Celular, del Instituto de Investigación de Ciencias Odontológicas (ICOD), Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Además, esta tesis fue posible gracias a los siguientes proyectos y becas:

1. Proyecto FONDECYT #1140907.
2. Proyecto FONDECYT #1180495.
3. CONICYT-FONDAP #15130011.

#### **Financiamiento otorgado a Solange Rivas Vera.**

1. Beca de estudios de Doctorado en Chile CONICYT 2114100, período 2014-2018.
2. Beca de asistencia a eventos y cursos cortos para estudiantes de doctorado, convocatoria 2016. “XXX Annual Meeting of the Sociedad de Biología Celular de Chile. November 2-6, 2016, Puerto Varas – Chile.
3. Otorgamiento del 100% del capital de Gastos Operacionales para desarrollo de tesis Doctoral 21141001. Conicyt 2016.

**Manuscritos:**

**Manuscrito derivado de la primera Unidad de Investigación realizada en el Laboratorio Genómica del Cáncer dirigida por la Dra. Katherine Marcelain Cubillos.**

**Solange Rivas**, Ricardo Armisen, Diego A. Rojas, Edio Maldonado, Hernán Huerta, Julio C. Tapia, Jaime Espinoza, Alicia Colombo, Luis Michea, Michael J. Hayman, Katherine Marcelain. “The Ski Protein is Involved in the Transformation Pathway of Aurora Kinase A”. *Journal of Cellular Biochemistry* 2015; 117(2):334-43.

**Parte de la investigación derivada de este trabajo de tesis fue publicada en el siguiente artículo:**

Patricio Silva, Pablo Mendoza, **Solange Rivas**, Jorge Díaz, Carolina Moraga, Andrew F.G. Quest and Vicente A. Torres. “Hypoxia promotes Rab5 activation, leading to tumor cell migration, invasion and metastasis”. *Oncotarget* 2016; 7(20): 29548-29562.

**La investigación derivada de este trabajo de tesis, será enviada para publicación a la Revista Clinical Cancer Research como el siguiente artículo:**

**Solange Rivas**, Patricio Silva, Cecilia Arriagada, Montserrat Reyes, Hugo Sepúlveda, Luis Solano, Martín Montecino and Vicente A. Torres. “The RabGEF ALS2 is an hypoxia inducible target associated with the acquisition of aggressive traits in tumor cells and overexpressed in cancer”.

## Presentación a Congresos de Sociedades Científicas

### 1.- Septiembre 2016: ACCDIS Cancer Spring Symposium:

*Solange Rivas, Patricio Silva, Vicente Torres. Rab5 is activated by HIF-1 $\alpha$  under hypoxic and non-hypoxic conditions.*

- *Reconocimientos: Biochemical Journal honorable mention best poster.*

### 2. November 2016: Chilean Society for Cell Biology. XXX Annual Meeting, Puerto Varas-Chile:

*Solange Rivas, Patricio Silva, Vicente Torres. Rab5 is activated by HIF-1 $\alpha$  under hypoxic and non-hypoxic condition.*

### 3. October 2017: Chilean Society for Cell Biology. XXXI Annual Meeting, Puerto Varas

*Solange Rivas, Patricio Silva, Vicente Torres. Identification of novel Rab5 GEF induced by hypoxia.*

## ÍNDICE TEMÁTICO

<b>I. RESUMEN</b> .....	13
<b>II. RESUMEN EN INGLÉS</b> .....	15
<b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
o El cáncer.....	17
o Hipoxia y progresión del cáncer.....	18
o HIF-1 $\alpha$ , el Factor de Transcripción Inducible por Hipoxia.....	19
o Mecanismos moleculares implicados en la migración e invasión celular inducidos por hipoxia.....	20
o Papel de Rab5 en la migración e invasión de células tumorales.....	22
o GEFs de Rab5 en cáncer.....	24
o Rab5 es activada por la hipoxia y es requerida para la migración e invasión de células tumorales inducidas por hipoxia.....	25
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	28
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b> .....	28
<b>VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	28
<b>VII. METODOLOGÍA</b> .....	29
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	35
<b>1. Determinar si HIF-1<math>\alpha</math> induce la activación de Rab5, tanto por estímulos dependientes como independientes de hipoxia</b> .....	35
1.1 El aumento de Rab5-GTP en hipoxia es dependiente de HIF-1 $\alpha$ .....	35
1.2 La inhibición de HIF-1 $\alpha$ disminuye los niveles de Rab5-GTP potenciados por la hipoxia.....	38
1.3 La expresión ectópica de HIF-1 $\alpha$ provoca un aumento de Rab5-GTP en normoxia.....	40
1.4 La estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$ aumenta los niveles de Rab5-GTP.....	42
<b>2. Identificar GEFs de Rab5 inducidas por hipoxia y determinar si esta inducción depende del factor de transcripción HIF-1<math>\alpha</math>, tanto por estímulos dependientes como independientes de hipoxia</b> .....	45
2.1- Varias GEFs de Rab5 están involucradas en progresión tumoral y contienen elementos de respuesta a la hipoxia (HREs) putativos.....	45
2.2. Las GEFs de Rab5 RIN2, RIN3 y ALS2 son inducidas por hipoxia.....	45
2.3 La estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$ aumenta la expresión de la GEF ALS2.....	49



2.4 HIF-1 $\alpha$ es necesario para aumentar los niveles proteicos de ALS2.....	51
2.5 El HRE putativo proximal de ALS2 es un sitio potencial de la transcripción.....	54
2.6. El HRE putativo proximal de ALS2 posee secuencias aledañas similares a algunos blancos de HIF-1 $\alpha$ .....	57
2.7 HIF-1 $\alpha$ se une al HRE proximal de ALS2 y aumenta en hipoxia.....	58
<b>3. Determinar si las GEFs inducidas por HIF-1<math>\alpha</math> participan en la activación de Rab5, promueven la migración y la invasión de células tumorales en hipoxia.....</b>	<b>61</b>
3.1 ALS2 es necesario para el aumento de Rab5-GTP promovido por la hipoxia.....	61
3.2 La migración celular inducida por la hipoxia es dependiente de la expresión de ALS2.....	63
3.3 La invasión celular inducida por la hipoxia es dependiente de la expresión de ALS2.....	65
<b>IX. DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>X. CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>XI. PROYECCIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>XII. ANEXOS.....</b>	<b>78</b>
<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>89</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

○ <b>FIGURA 1:</b> Origen y progresión del cáncer.....	18
○ <b>FIGURA 2:</b> La hipoxia promueve la adaptación de células tumorales.....	19
○ <b>FIGURA 3:</b> Ciclo de activación de Rab5.....	22
○ <b>FIGURA 4:</b> Rab5 y la migración celular.....	23
○ <b>FIGURA 5:</b> La hipoxia aumenta la activación de Rab5.....	26
○ <b>FIGURA 6:</b> La migración e invasión de células tumorales inducidas por la hipoxia es dependiente de Rab5.....	26
○ <b>FIGURA 7:</b> El silenciamiento de HIF-1 $\alpha$ disminuye los niveles de Rab5-GTP.....	37
○ <b>FIGURA 8:</b> La inhibición farmacológica de HIF-1 $\alpha$ previene el aumento en los niveles de Rab5-GTP frente a hipoxia.....	39
○ <b>FIGURA 9:</b> La estabilización ectópica de una mutante no degradable de HIF-1 $\alpha$ aumenta los niveles de Rab5-GTP en normoxia.....	41
○ <b>FIGURA 10:</b> La estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$ aumenta los niveles de Rab5-GTP en la línea celular RCC.....	43
○ <b>FIGURA 11:</b> La hipoxia induce aumentos en los niveles de mRNA de RIN2, RIN3 y ALS2.....	48
○ <b>FIGURA 12:</b> La estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$ está asociada a aumentos en los niveles de mRNA de la GEF de Rab5 ALS2.....	50
○ <b>FIGURA 13:</b> La hipoxia y la estabilización de HIF-1 $\alpha$ aumentan la expresión de ALS2.....	52
○ <b>FIGURA 14:</b> La estabilización de HIF-1 $\alpha$ es requerida para la expresión de ALS2.....	53
○ <b>FIGURA 15:</b> Análisis bioinformático de H3K27Ac y zonas hipersensibles a DNAsa I en la región promotora de ALS2.....	56
○ <b>FIGURA 16:</b> Identificación del sitio de unión de HIF-1 $\alpha$ en el promotor de la GEF de Rab5 ALS2.....	59
○ <b>FIGURA 17:</b> Cuantificación de los niveles de Rab5-GTP en células A549 expuestas a niveles disminuidos de ALS2 en normoxia e hipoxia por 24 h.....	62
○ <b>FIGURA 18:</b> Cuantificación de la capacidad migratoria de células A549 expuestas a niveles disminuidos de ALS2 en condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h.....	64
○ <b>FIGURA 19:</b> Estudio de la capacidad invasiva de células A549 expuestas a niveles disminuidos de ALS2 en condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h.....	66
○ <b>FIGURA 20:</b> Modelo de tesis propuesto.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS (S):

- **Figura S1:** Curva dosis-respuesta de siRNAs control y HIF-1 $\alpha$  en hipoxia de 24 h.....78
- **Figura S2:** Las células A549 sh-HIF-1 $\alpha$  disminuyen el 50% de la expresión de Rab5-GTP en hipoxia. ....79
- **Figura S3:** Cuantificación de los niveles de Rab5 total y Actina posterior al silenciamiento, expresión ectópica y endógena de HIF-1 $\alpha$ ..... 80
- **Figura S4:** Análisis *in-silico* de las secuencias promotoras de distintas GEFs de Rab5. ....81
- **Tabla S1 :** GEFs de Rab5 que participan en la promoción de características tumorales y poseen varios HREs putativos de HIF-1.....82
- **Tabla S2 :** Diseño de partidores para RT-qPCR para las diversas GEFs en estudio.....83
- **Figura S5:** Análisis de los niveles de mRNA de las GEFs de Rab5 en condiciones de normoxia e hipoxia por 6 y 12 h .....84
- **Figura S6:** Silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  en la evaluación de los niveles de mRNAs de las GEFs RIN2, RIN3 y ALS2 .....85
- **Figura S7:** Transfección pcDNA 3.1 HIF-1 $\alpha$  wt y pcDNA 3.1 HIF-1 $\alpha$  (P402A/P564A) en la evaluación de los niveles de mRNAs de las GEFs RIN2, RIN3 y ALS2.....86
- **Tabla S3 :** Diseño de partidores para Chip qPCR.....87
- **Figura S8:** Curva dosis-respuesta para evaluar la efectividad de siRNA-control y siRNA-ALS2 en hipoxia de 24 h..... 88

## ABREVIATURAS:

- **ALS2** : Esclerosis lateral amiotrófica tipo 2
- **CDC-42** : Ciclo de división celular 42
- **cDNA** : Secuencia complementaria de ácido deoxirribonucleico codificante de proteínas
- **ChIP** : Inmunoprecipitación de cromatina
- **C-MET** : MET protooncogén, receptor tirosina quinasa.
- **CXCR4** : Receptor 4 de quimiocina, motivo C-X-C
- **DMSO** : Dimetilsulfóxido
- **GAP** : Proteína activadora de actividad GTPasa
- **GDP** : Difosfato de guanosina
- **GEF** : Factor intercambiador de nucleótido de guanosina
- **GST** : Glutación S-transferasa
- **GTP** : Trifosfato de guanosina
- **H** : Hipoxia
- **h** : Horas
- **H3K27Ac**: Acetilación de la lisina 27 en la histona 3
- **HAC** : Acetiltransferasas de histonas
- **HIF-1 $\alpha$**  : Subunidad 1 $\alpha$  del factor de transcripción inducible por hipoxia
- **HIF-1 $\beta$**  : Subunidad 1 $\beta$  del factor de transcripción inducible por hipoxia
- **HRE** : Elemento de respuesta a la hipoxia
- **IARC** : Agencia Internacional para la investigación del cáncer
- **Kb** : Kilobase
- **mL** : Mililitro
- **mM** : Milimolar
- **mm de Hg**: Milímetro de mercurio
- **mRNA** : Ácido ribonucleico mensajero
- **N** : Normoxia
- **O<sub>2</sub>** : Oxígeno
- **Pb** : Pares de bases
- **PBS** : Solución amortiguadora de fosfato
- **PGK1** : Fosfoglicerato quinasa 1
- **pO<sub>2</sub>** : Presión parcial de oxígeno
- **P4HA1** : Prolil 4-hidroxilasa, Subunidad alfa
- **Rab** : GTPasa Ras relacionada al cerebro

- **RABEX-5**: Factor de intercambio asociado a rabaptin-5 para Rab5
- **RAC1** : GTPasa pequeña 1 de la familia RAC
- **RCC** : Carcinoma de células renales
- **RhoA** : Familia de genes homólogos de Ras, miembro A
- **RIN** : Interactor de Rab y Ras
- **ROS** : Especies reactivas de oxígeno
- **RTqPCR** : Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- **shRNA** : Ácido ribonucleico de horquilla corta
- **siRNA** : Ácido ribonucleico interferente pequeño
- **TBS** : Solución salina tamponada con tris
- **TERT** : Transcriptasa inversa de telomerasa
- **μL** : Microlitros
- **VEGFA** : Factor de crecimiento endotelio vascular tipo A
- **VHL** : Von Hippel Lindau
- **WT** : Tipo silvestre

## I. RESUMEN

### LA ESTABILIZACIÓN DE HIF-1 $\alpha$ INDUCE LA EXPRESIÓN DE GEFs CLAVES PARA LA ACTIVACIÓN DE RAB5

**INTRODUCCIÓN:** Estudios previos de nuestro laboratorio evidenciaron que la GTPasa pequeña Rab5 promueve la adquisición y mantención de características de malignidad tumoral en condiciones de hipoxia, lo cual pareciera ser dependientes del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , pero sin cambios evidentes en los niveles de Rab5 total, sino que solo se observó un incremento de su activación. Este aumento de Rab5-GTP dependiente de la hipoxia potenció posteriormente la migración, invasión y metástasis en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Dado que la activación de Rab5 es promovida por factores de intercambio de nucleótido de guanina (GEFs) específicos, y que algunos de ellos participan en la migración celular, se plantea la siguiente **hipótesis**: “La estabilización de HIF-1 $\alpha$  aumenta los niveles de Rab5-GTP mediante la inducción transcripcional de GEFs, promoviendo la migración e invasión tumoral en las líneas celulares A549 y RCC”.

Para abordar esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos: (1) Determinar si HIF-1 $\alpha$  induce la activación de Rab5 por estímulos dependientes e independientes de hipoxia celular. (2) Identificar GEFs de Rab5 inducidas por hipoxia y determinar si esta inducción depende de HIF-1 $\alpha$ . (3) Determinar si la GEF ALS2 inducida por HIF-1 $\alpha$  participa en la activación de Rab5, la migración y la invasión de células tumorales en hipoxia. **METODOLOGÍA:** Los niveles de Rab5-GTP fueron medidos utilizando la técnica de pull-down en la línea celular de carcinoma renal RCC, RCC<sup>+vhl</sup> y en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A549. La expresión y actividad de HIF-1 $\alpha$  fueron disminuidas mediante la transfección de RNAs interferentes (siRNAs) y con el uso de un inhibidor farmacológico selectivo contra HIF-1 $\alpha$  (inhibidor C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub>), respectivamente. Ambos tratamientos fueron realizados en condiciones de hipoxia y normoxia por 24 h. Además, se midieron los niveles de Rab5-GTP de forma independiente a la hipoxia, determinándose la dependencia de HIF-1 $\alpha$  mediante la transfección ectópica con los plasmidios codificantes para HIF-1 $\alpha$ /WT o HIF-1 $\alpha$ /P402A/P564A (mutante no degradable) en normoxia, y el uso de células RCC que estabilizan a HIF-1 $\alpha$  de forma endógena. Los niveles de mRNA de las GEFs de Rab5 (Rabex-5, RIN1, RIN2, RIN3 y ALS2) se midieron por RTqPCR y posteriormente, se evaluaron los niveles proteicos de la(s) GEF(s) seleccionada(s). Además se evaluó la expresión de esta(s) GEF(s) en células de carcinoma renal RCC y RCC<sup>+vhl</sup>. Posteriormente identificamos elementos de respuesta a hipoxia (HREs) putativos en la secuencia genética de ALS2 (una de las GEFs identificadas) mediante análisis *in-silico*. Para determinar una posible interacción física entre el promotor de ALS2 y HIF-1 $\alpha$ , se realizó la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Finalmente, las células A549 fueron transfectadas con siRNAs contra ALS2, para luego evaluar los niveles de Rab5-GTP utilizando la

técnica de pull-down, migración mediante transwell y la invasión tumoral mediante el uso de matriges, todo lo anterior se realizó bajo el estímulo normoxia e hipoxia. **RESULTADOS:** La estabilización de HIF-1 $\alpha$  fue necesaria para la activación de Rab5 por hipoxia, como se demostró mediante los tratamientos con siRNA y el inhibidor C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub>. También observamos que la estabilización de HIF-1 $\alpha$  independientemente de la hipoxia tumoral, indujo la activación de Rab5, lo cual se demostró mediante la transfección con HIF-1 $\alpha$  (P402A/P564A) y el uso de células RCC. También, la hipoxia aumentó los transcritos de las GEFs RIN2, ALS2 y RIN3, mientras que en el modelo celular RCC, la estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$  en normoxia, aumentó solo la expresión de ALS2. Posteriormente, cuando se cuantificaron los niveles proteicos, observamos que tanto las células A549 sometidas a hipoxia como las células RCC en normoxia, poseen mayores niveles proteicos de ALS2, los cuales fueron dependientes de la expresión de HIF-1 $\alpha$ , como se observó además al utilizar el inhibidor C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub> y siRNA contra HIF-1 $\alpha$ . Luego, mediante la técnica de ChIP en condiciones de hipoxia, se demostró que HIF-1 $\alpha$  se une físicamente al promotor del gen de ALS2, específicamente en el *HRE*(-782/-788). Finalmente, se observó que ALS2 fue necesaria para la activación de Rab5, para la migración celular y la invasión de células tumorales en condiciones de hipoxia. **DISCUSIÓN:** En este trabajo, demostramos que la hipoxia y HIF-1 $\alpha$  promueven la expresión de la GEF de Rab5 ALS2, la cual es necesaria para la activación de Rab5, migración e invasión celular sean inducidas en condiciones de hipoxia. También reportamos por primera vez que HIF-1 $\alpha$  se une directamente al promotor proximal de ALS2 en células tumorales A549, presentando el primer enlace entre ALS2 y la mantención de características asociadas con la malignidad tumoral inducida por hipoxia, lo cual ocurre vía HIF-1 $\alpha$ .

## II. ABSTRACT

### HIF-1 $\alpha$ STABILIZATION INDUCES THE EXPRESSION OF KEY GEFs FOR RAB5 ACTIVATION

**INTRODUCTION:** Previous studies from our lab have shown that the small GTPase Rab5 promotes the acquisition and maintenance of characteristics associated with malignancy in hypoxia and dependent on the transcription factor HIF-1 $\alpha$ , which stimulates Rab5 activity, leading to increased tumor cell migration, invasion and metastasis, as shown in *in-vitro* and *in vivo* models. Given that the activation of Rab5 is promoted by specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs), and that some of them participate in cell migration, the following **hypothesis** is proposed: “HIF-1 $\alpha$  increases the level of Rab5-GTP in hypoxia through the transcriptional induction of GEFs who promotes the migration and invasion of tumor cells A549 and RCC”. To address this hypothesis, the following objectives were proposed: (1) To determine if HIF-1 $\alpha$  induces the activation of Rab5 by dependent and independent stimuli of cellular hypoxia. (2) Identify Rab5 GEFs induced by hypoxia and determine if this induction depends on HIF-1 $\alpha$ . (3) To determine if GEF ALS2 induced by HIF-1 $\alpha$  participates in the activation of Rab5, migration and invasion of tumor cells in hypoxia.

**METHODOLOGY:** Rab5-GTP levels were measured in pull-down assays, using two complementary models, A549 lung adenocarcinoma cells exposed to hypoxia, and the renal cell carcinoma (RCC and RCC<sup>+vhl</sup>) model, which allows endogenous stabilization of HIF-1 $\alpha$  (independently of hypoxia). HIF-1 $\alpha$  expression and activity were reduced by small interference RNA (siRNA) and pharmacological inhibition (C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub> inhibitor of HIF-1 $\alpha$ ), respectively. These treatments were performed under normoxia or hypoxia for 24 h. Moreover, Rab5-GTP levels were measured independently of hypoxia upon ectopic transfection with plasmids encoding for HIF-1 $\alpha$ /WT and HIF-1 $\alpha$ /P402A/P564A (non-degradable mutant) and in RCC cells exposed to the C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub> inhibitor. The mRNA levels for Rab5-GEFs Rabex-5, RIN1, RIN2, RIN3 and ALS2 were measured by RT-qPCR, and then, selected GEFs were validated by Western blotting in RCC (non-hypoxia) and A549 (hypoxia) models, and the requirement of HIF-1 $\alpha$  was evaluated by siRNA and pharmacological inhibition. Thereafter, by an *in-silico* analysis, we identified putative Hypoxia Response Elements (HREs) in the promoter region of the gene encoding for ALS2. To evaluate a possible interaction between the ALS2 promoter and HIF-1 $\alpha$ , we performed Chromatin Immunoprecipitation assays (ChIP). Finally, A549 cells were transfected with siRNA sequences targeting ALS2, to evaluate its requirement for Rab5-GTP loading, cell migration and invasion induced by hypoxia. **RESULTS:** HIF-1 $\alpha$  was required for Rab5 activation by hypoxia, as shown by several approaches, including siRNA targeting and pharmacological inhibition of HIF-1 $\alpha$  under hypoxic conditions. Also, we observed that HIF-1 $\alpha$  stabilization (independently of hypoxia) is enough



to promote Rab5 activation, as shown in transfection experiments with a stabilized mutant of HIF-1 $\alpha$  (P402A/P564A) and in the RCC/RCC<sup>+vhl</sup> model of endogenous HIF-1 $\alpha$  stabilization. Moreover, hypoxia augmented mRNA levels of RIN2, RIN3 and ALS2; however, in RCC cells, endogenous stabilization of HIF-1 $\alpha$  increased ALS2 mRNA levels, but not those encoding for any other GEFs. By western blotting, we showed that both hypoxia and endogenous stabilization of HIF-1 $\alpha$  (RCC model) increase ALS2 protein levels, in a manner that depended on HIF-1 $\alpha$ , as shown by siRNA and pharmacological approaches. Our ChIP experiments showed that HIF-1 $\alpha$  binds to the putative HRE sequence (-782/-788 pb) in the promoter of ALS2. Finally, by siRNA-mediated targeting, we observed that ALS2 is necessary for Rab5 activation, cell migration and invasion under hypoxic conditions. **DISCUSSION.** In this work, we demonstrated that hypoxia and HIF-1 $\alpha$  promote the expression of the Rab5-GEF ALS2, which is necessary for Rab5-GTP loading, tumor cell migration and invasion induced by hypoxia. Also, we report for the first time that HIF-1 $\alpha$  binds directly to the ALS2 promoter in A549 tumor cells, representing the first link between ALS2 and the maintenance of characteristics associated with tumor malignancy induced by hypoxia via HIF-1 $\alpha$ .

### III. INTRODUCCIÓN

Estudios recientemente publicados por la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC) perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, reportaron que durante el período que comprende el año 2018, a nivel mundial, fallecieron 9.555.027 personas a causa del cáncer y, en nuestro país, fallecieron 95.700 personas, lo cual superó 3,8 veces la mortalidad publicada el año 2015 (Ferlay et al., 2015). Al mismo tiempo, la Organización Mundial de la Salud, estimó que para el año 2030, la tasa de mortalidad por cáncer aumentaría a 16.388.459 pacientes (Ferlay et al., 2018). Por este motivo, resulta de gran interés estudiar, conocer y divulgar los mecanismos celulares y moleculares que utilizan las células tumorales para alcanzar las etapas avanzadas del cáncer.

#### EL CÁNCER

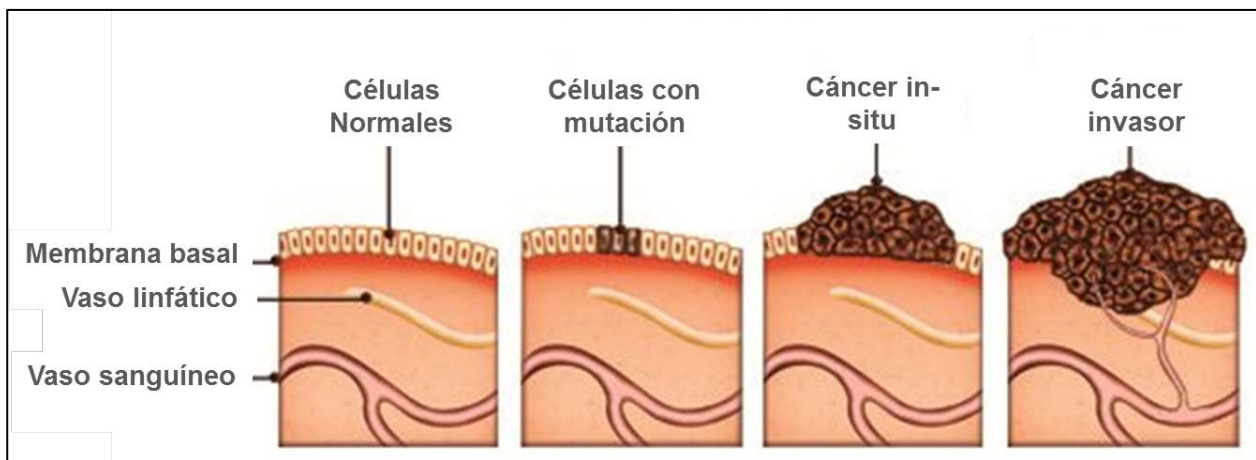
El cáncer es un síndrome genético multifactorial, que comienza con mutaciones en genes que controlan el progreso del ciclo celular (Burkhart & Sage, 2008, Deshpande *et al.*, 2005). Si estas mutaciones no son corregidas por los respectivos sistemas de reparación, pueden desencadenar un descontrol en la proliferación celular.

El aumento en la proliferación de las células tumorales, induce un aumento del metabolismo energético, lo cual puede ser acompañado además, por la inhibición de la muerte celular programada, dando lugar a la formación de masas compuestas por células tumorales aberrantes que posteriormente, desencadenan alteraciones en el funcionamiento normal del tejido de origen (Egeblad *et al.*, 2010).

A medida que las células tumorales acumulan mutaciones, comienzan a adquirir un fenotipo mesenquimal, desarrollando así la capacidad de migrar y digerir la membrana basal. De esta forma, las células tumorales pueden invadir tejidos vecinos cuando alcanzan el sistema vascular y linfático, mediante el cual las células cancerosas se trasladan a órganos distantes. Este evento es un proceso conocido como metástasis, y provoca la muerte de los pacientes afectados por la enfermedad (Nguyen *et al.*, 2009) (figura 1).

A medida que el tamaño tumoral aumenta, también aumenta la demanda de oxígeno por parte de las células tumorales. En este instante, las células cancerosas expuestas a bajos niveles de oxígeno, responden promoviendo cambios adaptativos, entre los cuales destacan la inducción y secreción de factores proangiogénicos, promoviendo la proliferación y migración de células endoteliales para inducir la angiogénesis (Dang & Semenza, 1999, Hanahan & Weinberg, 2011). Sin embargo, en condiciones tumorales, la nueva red vascular se presenta desorganizada y poco eficiente en términos del aporte de nutrientes y oxígeno al tumor (Hashizume *et al.*, 2000).

Como resultado de la ineficiente angiogénesis, las células más alejadas a la fuente de irrigación experimentan un bajo suministro de oxígeno, la cual es una característica propia del microambiente tumoral conocida como *hipoxia tumoral* (Bertout *et al.*, 2008).



**Figura 1. Origen y progresión del cáncer.** Las mutaciones en genes claves (puntos de control) para la proliferación o muerte celular, llevan a un aumento de la capacidad proliferativa, metabólica, angiogénica e invasiva de las células tumorales, entre otras (Hanahan & Weinberg, 2011). Una vez que las células tumorales evaden todo tipo de control, tal como la apoptosis y la proliferación, la masa tumoral comienza a crecer e induce la secreción de factores proangiogénicos. De esta manera, las células tumorales sustentan la rápida proliferación y crecimiento tumoral. Posteriormente las células tumorales comienzan a degradar la membrana basal para invadir tanto tejidos vecinos, como distantes (metástasis), siendo este último uno de los principales eventos asociados a una alta mortalidad.

## HIPOXIA Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER

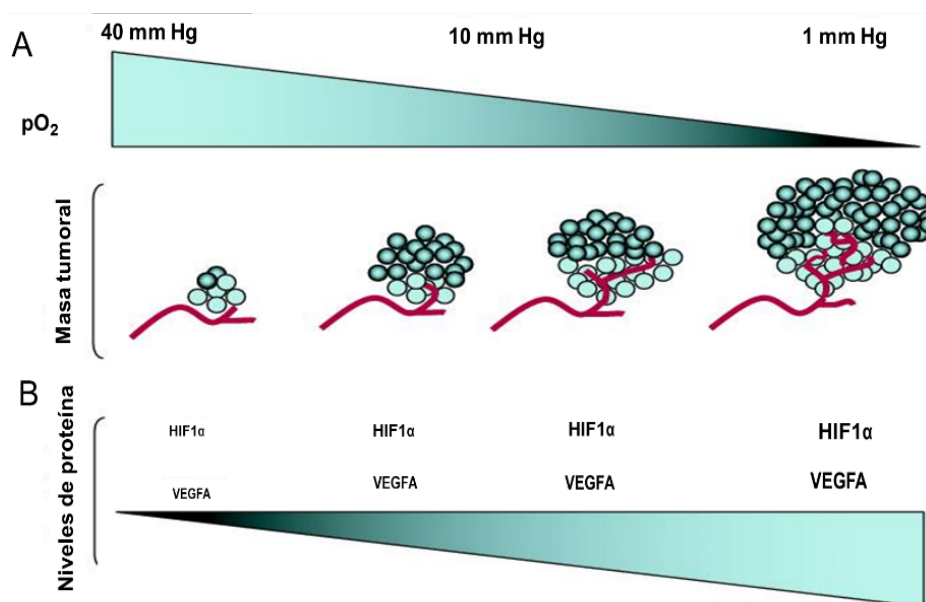
El aire que inspiramos se distribuye dentro del cuerpo en relación a los requerimientos metabólicos y estado funcional de cada órgano y tejido. De esta forma, en condiciones fisiológicas, cada órgano posee su propio estado de oxigenación normal o estado de normoxia (Carreau *et al.*, 2011).

La presión parcial de oxígeno ( $pO_2$ ) que inspiramos es de 160 mm de Hg (situación a nivel del mar), lo que corresponde a un 21% de oxígeno ambiental. Una vez en los pulmones, el oxígeno se transporta a través de la circulación sanguínea, desde los capilares alveolares a los diversos órganos y tejidos con un consumo fisiológico de oxígeno entre un 2 y 9%, por lo que valores inferiores al 2% de oxígeno (o 10 mm Hg), se definen como *hipoxia celular* (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2007).

La hipoxia a nivel tumoral, es definida como la disminución de los niveles parciales de oxígeno en el microambiente de las células tumorales, donde las células más alejadas a la fuente de irrigación son las células más afectadas (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2007). En este contexto, la hipoxia, es capaz de promover el desarrollo de respuestas adaptativas, induciendo la transcripción de diversos genes

relacionados con la sobrevida, como el aumento del potencial angiogénico, metabólico y metastásico de las células tumorales (Brizel *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 2010, Graham *et al.*, 1999, Lunt *et al.*, 2009, Sullivan & Graham, 2007) (ver figura 2).

De esta forma, la hipoxia ha sido reconocida como un importante inductor de eventos oncogénicos y de respuestas tumorales adaptativas. Estas respuestas adaptativas son en gran parte, mediadas por el factor de transcripción inducible por hipoxia, HIF-1 (Hipoxia Inducible Factor 1), el cual ha sido reconocido como el regulador maestro de la homeostasis del oxígeno y respuestas relacionadas a la sobrevida de las células tumorales (Vaupel & Mayer, 2007).



**Figura 2. La hipoxia tumoral promueve la adaptación de las células cancerosas.** A) A medida que aumenta el tamaño de la masa tumoral, la presión parcial de oxígeno disminuye, afectando principalmente a las células tumorales más lejanas a la fuente de irrigación (células azules oscuras). En respuesta, las células tumorales inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) para intentar compensar los niveles de oxígeno. B) A medida que disminuyen los niveles parciales de oxígeno, HIF-1 $\alpha$  se estabiliza y promueve la expresión de respuestas adaptativas, entre ellas la inducción transcripcional y posterior síntesis proteica de VEGFA. Adaptado de Brahim-Horn C, Pouyssegur J. *Bull Cancer* 2006, Vol. 93 (8), 73-80.

## HIF-1 $\alpha$ , EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE POR HIPOXIA

HIF-1 es un heterodímero compuesto por 2 subunidades, una es HIF-1 $\beta$ , la cual se expresa de forma constitutiva a nivel nuclear y HIF-1 $\alpha$ , la cual en normoxia, posee una vida media corta (2 minutos), ya que su degradación es regulada por oxígeno. De esta manera, la expresión de HIF-1, es determinada principalmente por la estabilización de la subunidad HIF-1 $\alpha$  y posterior heterodimerización con HIF-1 $\beta$  a nivel nuclear (Chan & Giaccia, 2007).

La subunidad HIF-1 $\alpha$  es inestable en normoxia, ya que es degradada de forma constante. La señal de degradación de HIF-1 $\alpha$  comienza con la acción de las enzimas prolil-hidroxilasas, las que posterior a su activación, reconocen los residuos de prolinas 402 y 564 de HIF-1 $\alpha$  y posteriormente adicionan un grupo hidroxilo (OH) (Wang & Semenza, 1995). Esta señal de hidroxilación, lleva a que posteriormente la proteína supresora de tumores Von Hippel Lindau (VHL), la cual actúa como E3 ubiquitin-ligasa, reconozca a HIF-1 $\alpha$  hidroxilada, marcándola para su degradación vía proteosoma (Huang *et al.*, 1998).

Por otra parte, en condiciones de hipoxia, HIF-1 $\alpha$  no es hidroxilada, ya que las prolil-hidroxilasas dependientes de oxígeno permanecen inactivas y por lo tanto, HIF-1 $\alpha$  no se degrada y se acumula en el citoplasma. Esta acumulación de HIF-1 $\alpha$  la lleva a su translocación nuclear y posterior heterodimerización con la subunidad HIF-1 $\beta$ , constituyéndose así la forma activa de HIF-1. Cuando HIF-1 es activada, reconoce y se une a elementos de respuesta a la hipoxia (HREs), los que corresponden a una secuencia de nucleótidos altamente conservada (5'-[A/G]CGTG-3') y presente en el promotor de los genes blancos de HIF-1 (Semenza, 1998).

Los genes transcritos por HIF-1, pueden ser agrupados en factores angiogénicos y transportadores de oxígeno, transportadores de glucosa y enzimas glicolíticas, citoquinas y factores de crecimiento, adhesión celular, migración, invasión y metástasis, entre otros (Eisinger-Mathason *et al.*, 2013, Semenza, 1998, Vaupel & Mayer, 2007).

En los últimos años, se ha establecido una relación directa entre la hipoxia tumoral, la metástasis, y el mal pronóstico de pacientes con diferentes tipos de cánceres, situación que ha aumentado el interés por identificar genes inducidos por HIF-1 que estén relacionados con el control de la migración e invasión de células tumorales, como eventos claves que conducen a la metástasis.

## **MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR INDUCIDOS POR HIPOXIA**

La migración celular es un proceso fundamental en diferentes contextos fisiológicos, tal como el desarrollo embrionario, la respuesta inmune, y la reparación de heridas, entre otros (Sieck, 2013). En contraparte, la migración celular descontrolada corresponde es una característica adquirida por las células tumorales, la cual es necesaria para que el tumor colonice otros tejidos (Parsons *et al.*, 2010). En particular, la migración de las células tumorales ha sido descrita como una serie de pasos secuenciales e interrelacionados que involucran la polarización celular, la formación de extensiones o *protrusiones* celulares, la formación de nuevos sitios de contacto con la matriz extracelular, seguido

de la contracción del cuerpo celular y el dismantelamiento de los complejos de adhesión célula-matriz, lo cual es reconocido como recambio de adhesiones focales (Parsons *et al.*, 2010). Todos estos eventos, describen actualmente la mecánica de la migración celular.

Las adhesiones sirven como puntos de tracción para el movimiento celular, pero además, inducen una red de eventos de señalización para regular la tasa de protrusiones, contractilidad y adhesión celular (Parsons *et al.*, 2010, Zaidel-Bar *et al.*, 2007). La maduración y dinámica de las adhesiones focales es estimulada por la activación de proteínas pertenecientes a la familia de las GTPasas Rho, como Rac1, RhoA y CDC42, que actúan en conjunto como interruptores moleculares, controlando el balance entre el ensamblaje y desensamblaje de adhesiones focales mediante la polimerización y contracción de actina (Choi *et al.*, 2008, Machacek *et al.*, 2009).

Los fenómenos moleculares claves para la invasión y diseminación tumoral de células epiteliales, son la pérdida de las adhesiones intercelulares, el aumento de la motilidad celular y la degradación/remodelamiento de la membrana basal (Imai *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2008). Este conjunto de eventos, conocido como invasión celular, requiere de la proteólisis de la membrana basal y de la matriz extracelular, lo cual es controlado por proteasas específicas, entre las que destacan las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), cuya expresión y/o actividad son comúnmente aumentadas en cáncer (Foda & Zucker, 2001, Kusakawa *et al.*, 1993).

Estudios recientes indican que la hipoxia y HIF-1 promueven la degradación de la membrana basal mediante el aumento de la transcripción y síntesis de diversas proteasas, como cathepsina D, el receptor activador de plasminógeno tipo uroquinasa y la metaloproteinasa MMP-2 y MMP-9 (Krishnamachary *et al.*, 2003). Además, tanto la hipoxia como HIF-1 aumentan la expresión de la enzima extracelular *lisil oxidasa*, la cual modifica las fibras de colágeno para aumentar la actividad de la quinasa de adhesiones focales (FAK), evento que conlleva a un aumento en la migración celular y la metástasis (Erler *et al.*, 2006).

Respecto a los fenómenos relacionados con la migración e invasión tumoral, recientemente se ha evidenciado que en hipoxia, HIF-1 es capaz de inducir la transcripción de reguladores claves en el remodelamiento del citoesqueleto de actina y la migración celular, como la GTPasa pequeña RhoA y la quinasa ROCK1, incrementando así la migración, invasión y metástasis de células tumorales (Gilkes *et al.*, 2014).

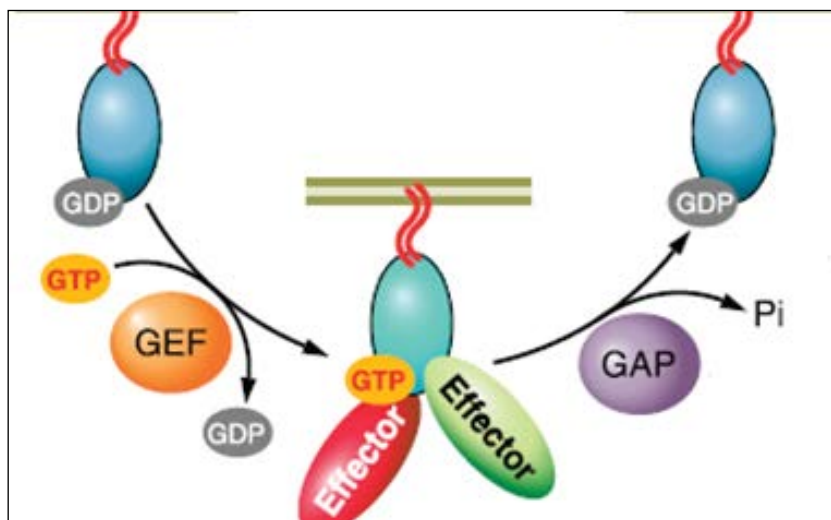
Consecuentemente, se ha incrementado la lista de GTPasas pequeñas inducidas por la estabilización de HIF-1 o por la hipoxia tumoral, entre las que destacan Ras, Rac, y CDC42 (Xue *et al.*, 2006, Zieseniss, 2014). Sin embargo, poco se conoce acerca de otras GTPasas que sean relevantes en el contexto de la migración celular, y que sean reguladas por la hipoxia. Lo anterior cobra relevancia, a

la luz de que numerosos estudios han vinculado a GTPasas de la familia Rab, las que han sido consideradas de forma canónica como reguladores maestros del tráfico endocítico y control de la migración celular (Mendoza *et al.*, 2013, Tzeng & Wang, 2016).

En relación con lo anterior, hemos demostrado recientemente que la hipoxia induce un aumento en la fracción activa de Rab5 (es decir, los niveles de Rab5-GTP), potenciando de esta manera la capacidad oncogénica de las células tumorales (Silva *et al.*, 2016).

### **PAPEL DE RAB5 EN LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE CÉLULAS TUMORALES**

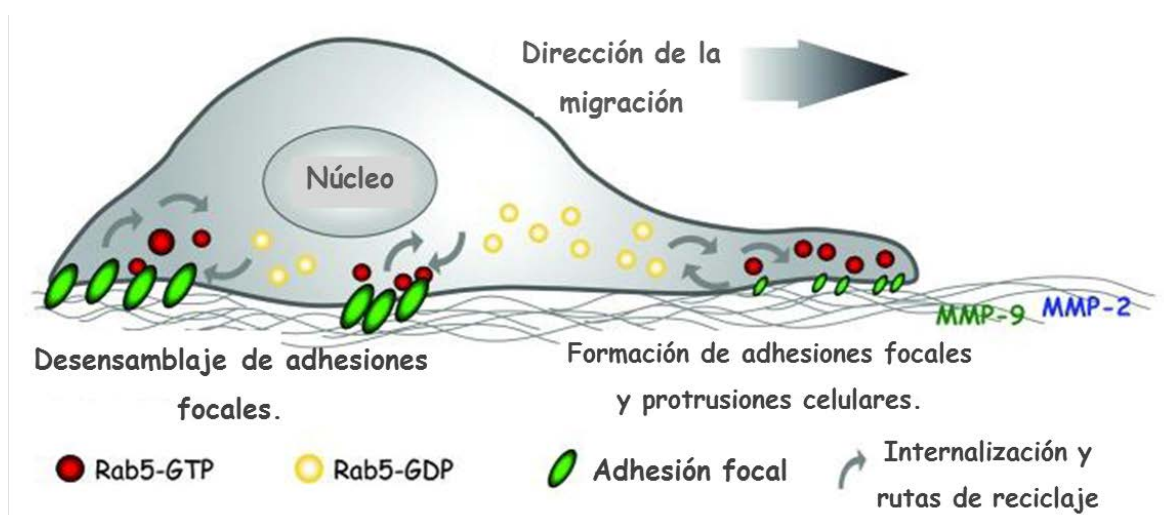
Rab5 es una GTPasa pequeña, cuyo rol canónico consiste en orquestar la formación de vesículas, así como la fusión y maduración de endosomas tempranos y el tráfico de estos a través de la red de microtúbulos (Christoforidis *et al.*, 1999, Nielsen *et al.*, 1999). Al igual que otras GTPasas, Rab5 cicla entre 2 conformaciones, una de ellas unida a GTP y otra unida a GDP, los cuales han sido definidos (desde el punto de vista funcional), como conformaciones activa e inactiva, respectivamente (Stenmark, 2009). Lo anterior es concertado por factores intercambiadores de nucleótido de guanina (**GEFs**), los cuales favorecen la unión de GTP, mientras que el estado inactivo es asistido por factores activadores de la actividad GTPasa (**GAPs**), los cuales promueven la hidrólisis del GTP hacia GDP (Dumas *et al.*, 1999) como se observa en la [figura 3](#).



**Figura 3. Ciclo de activación de Rab5.** Rab5, así como cualquier Rab en general, se sintetiza en un estado inactivo, es decir unida a GDP. Posteriormente a su inserción en membrana, es reconocida por GEFs específicas que favorecen el intercambio del nucleótido de GDP por GTP. Rab5-GTP se asocia con diferentes moléculas efectoras para inducir eventos de reconocimiento, fusión o destinación de membranas, así como vías de señalización específicas. Una vez cumplida su función, moléculas GAPs (proteínas activadoras de la actividad GTPasa) promueven la hidrólisis de GTP, retornando a Rab5 a su unión a GDP, es decir su conformación inactiva.

Diversos estudios de nuestro laboratorio y de otros grupos de investigación, han indicado que además de su función canónica, Rab5 promueve la migración celular en una amplia variedad de modelos de células tumorales, como las células de carcinoma pulmonar A549 (Mendoza et al., 2013), adenocarcinoma de colon HT-29 y melanoma murino B16-F10 (Diaz et al., 2014), MDA-MB-231, células de cáncer cervical HeLa, células de melanoma A375M2, células de carcinoma de colon BE, (Palamidessi et al., 2008), cáncer mamario MCF7 (Frittoli *et al.*, 2014), entre muchas otras (Mendoza *et al.*, 2014, Tang & Ng, 2009).

Específicamente, se ha descrito que Rab5 promueve la formación de lamelipodios (Frittoli *et al.*, 2014), la activación de Rac (Palamidessi *et al.*, 2008, Spaargaren & Bos, 1999) y la formación de complejos con integrinas  $\beta 1$ , acelerando su internalización y reciclaje (Pellinen & Ivaska, 2006, Torres *et al.*, 2010), así como también el recambio de las adhesiones focales (Mendoza *et al.*, 2013, Torres *et al.*, 2010). Estos eventos han sido descritos como resultado de la sobreexpresión de Rab5, o bien de un aumento en el estado de activación (Rab5-GTP), siendo muy probable en este último estado, la participación de alguna GEF. En este contexto, existen varias GEFs de Rab5 que además de promover el aumento de la fracción activa, participan en la migración, invasión y/o metástasis tumoral (revisado en (Mendoza *et al.*, 2014) (figura 4).



**Figura 4. Rab5 y la migración celular.** (Adaptado de (Mendoza *et al.*, 2014)). Rab5-GTP promueve la migración e invasión celular mediante su asociación a proteínas de adhesiones focales, promoviendo su desensamblaje para dirigir e inducir la migración celular direccional y sostenida.



## GEFS DE RAB5 EN CÁNCER

Todas las GEFs de Rab5 poseen en común el dominio GEF VPS9 (del inglés *Vacuolar protein sorting*) altamente conservado, desde levaduras hasta neuronas, y reconoce sólo a la GTPasa Rab5 (Carney *et al.*, 2006). En la literatura, algunas GEFs de Rab5 han sido vinculadas a procesos tumorales, entre las que destacan: **RIN2** (Saito *et al.*, 2002), la cual promueve la endocitosis de la integrina  $\beta_1$  y posterior activación de Rac, mediante el reclutamiento de la GEF TIAM1 a los endosomas tempranos, controlando así la adhesión de células endoteliales a la matriz extracelular, y promoviendo de esta manera, el remodelamiento de los vasos sanguíneos y angiogénesis, tanto en células normales como a nivel tumoral (Sandri *et al.*, 2012). Es así como se ha observado que la activación del eje de señalización Ras-RIN2-Rab5 en células MDCK tratadas con el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), es esencial durante la transición epitelio-mesénquima (EMT), ya que promueve la internalización de receptores de superficie como E-cadherina (Kimura *et al.*, 2006). Otra GEF de Rab5 importante en cáncer es **Rabex-5**, cuya sobre-expresión ha sido reportada en muestras de pacientes con cáncer gástrico. Y por otro lado, Rabex-5 induce también el crecimiento tumoral, según se ha demostrado en modelos de metastasis *in vivo*, donde su silenciamiento disminuyó de forma significativa las metástasis (Wang *et al.*, 2014).

Además, se ha evidenciado que la GEF de Rab5 **ALS2**, juega un papel clave como activador de Rab5, localizándose en endosomas tempranos y en el frente de avance celular, específicamente en el modelo de cancer cervical HeLa (Otomo *et al.*, 2003), Por otra parte, los mismos autores demostraron que una mutación o delección del dominio GEF VPS9 de ALS2, provoca un daño en las neuronas motoras eferentes al obstruir el tráfico endocítico y fusión endosomas tempranos dirigido por Rab5 (Hsu *et al.*, 2018).

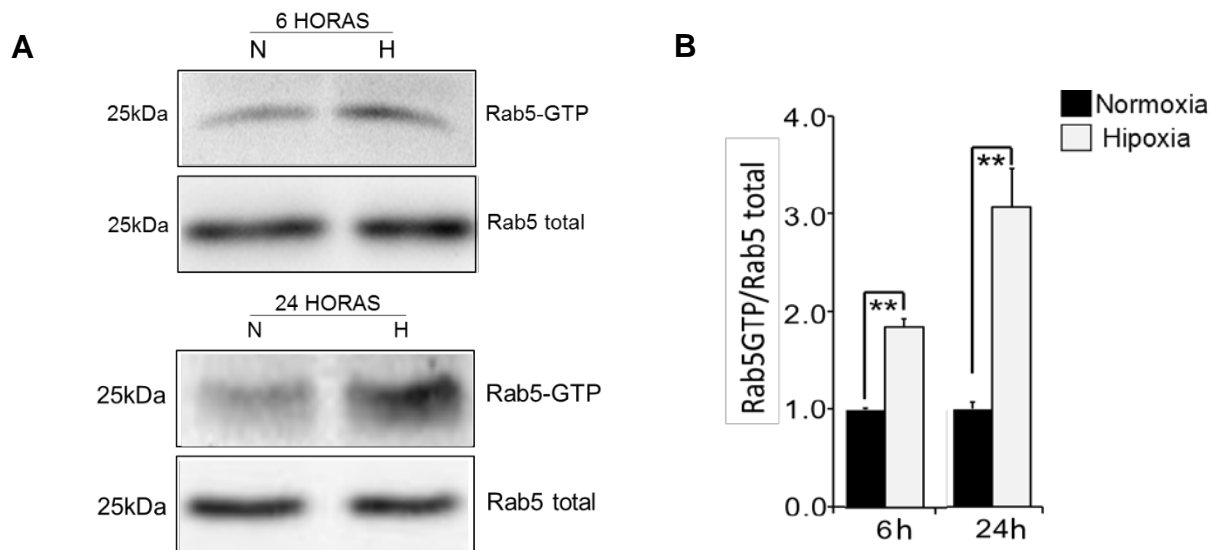
Además, recientemente se demostró que, luego de la inducción de estrés oxidativo en células tumorales, ALS2 activa a Rab5 en la mitocondria, siendo de esta manera, el complejo Rab5-ALS2 el encargado de promover la citoprotección, ralentizando eventos como la autofagia y apoptosis en células tumorales (Hsu *et al.*, 2018).

*Hasta el momento, los mecanismos por los cuales estas GEFs pueden ser reguladas en hipoxia son desconocidos, representando un área de intensa investigación, tanto en cáncer como en otras patologías.*

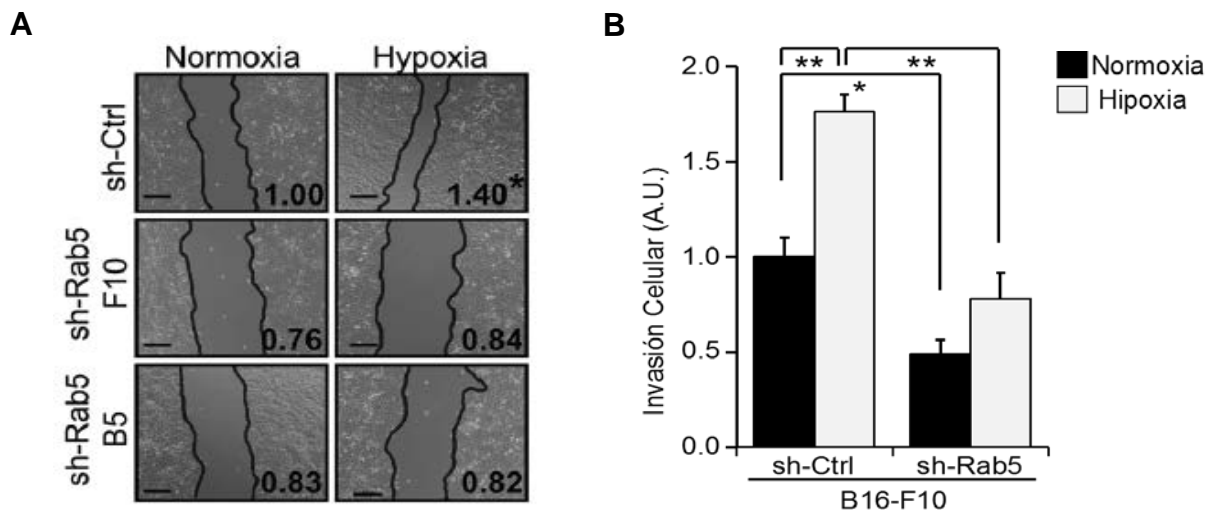
## **RAB5 ES ACTIVADA POR LA HIPOXIA Y ES REQUERIDA PARA LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE CÉLULAS TUMORALES INDUCIDAS POR HIPOXIA**

En los últimos años, nuestro laboratorio se ha dedicado a investigar una posible relación entre Rab5 y la hipoxia tumoral.

Previamente, se demostró que las células de carcinoma pulmonar A549 expuestas a hipoxia, muestran un aumento significativo de la fracción activa de Rab5 (Rab5-GTP), situación que fue observada en diferentes temporalidades, tanto a las 6 como a las 24 h de hipoxia (figura 5). Además, en ese estudio, también se demostró que la migración e invasión celular promovidas por la hipoxia, dependen de la expresión y actividad de Rab5 (figura 6) (Silva *et al.*, 2016).



**Figura 5. La hipoxia aumenta la activación de Rab5** (adaptado de (Silva et al., 2016)). **A.** Las células de adenocarcinoma pulmonar humano A549 fueron expuestas a normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>) por 6 y 24 h. Posteriormente se realizó la técnica de pull-down para obtener la fracción de Rab5 activa (Rab5-GTP), utilizando la proteína de fusión GST-R5BD, mostrando un aumento de Rab5-GTP a las 6 y 24 h de hipoxia. En **B**, los datos graficados corresponden al análisis densitométrico de las imágenes obtenidas en **A**, y expresadas como la normalización de la razón Rab5-GTP/Rab5 total. Los gráficos muestran el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos distintos (\*\*  $p < 0,01$ ).



**Figura 6. La migración e invasión de células tumorales inducidas por la hipoxia es dependiente de Rab5.** **A)** Las células A549 se crecieron a confluencia, y luego se indujo su migración por 24 h en hipoxia (H) y normoxia (N), utilizando suero bovino fetal como quimioatrayente. Los números dentro de los paneles en **A** muestran las veces de cambio de 4 experimentos independientes. **B)** Las células A549 fueron expuestas a 24 h de normoxia e hipoxia, luego se sembraron en un matrigel permitiendo la invasión celular por 24 h (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). Adaptada de Silva *et al.*, 2016.

Este conjunto de hallazgos abrieron nuevas interrogantes, dado que, si bien la hipoxia aumentó los niveles de Rab5-GTP, en ningún caso, y bajo ninguna de las condiciones evaluadas, se observaron cambios en la expresión total de Rab5 (Silva *et al.*, 2016). Más aún, de estos estudios realizados por Silva y Cols, resulta intrigante que la activación de Rab5 frente a la exposición a hipoxia por 24 h, sea sostenida en el tiempo, lo cual fue demostrado mediante la re-incubación de células en normoxia por 2 h posterior a 24 h de hipoxia, donde también no se observaron cambios significativos en los niveles totales de Rab5 (Silva *et al.*, 2016). Este antecedente nos sugiere que la activación de Rab5 por hipoxia representaría una respuesta adaptativa, es decir vía cambios en la expresión génica, pero en ausencia de fluctuaciones en los niveles totales de Rab5.

***Los hallazgos presentados previamente, nos llevan a plantear nuevas inquietudes, siendo una interrogante central el mecanismo por el cual la hipoxia activa a Rab5.***

La posibilidad de que la hipoxia active a Rab5 vía cambios en la expresión génica de otras moléculas es intrigante, y más aún, si en este fenómeno están involucrados intermediarios que promuevan la activación de Rab5, sin inducir cambios en Rab5 total. Dado que HIF-1 es el regulador maestro en respuestas adaptativas frente a la hipoxia, una posibilidad atractiva es que la activación de Rab5 por hipoxia sea modulada por GEFs inducidas por la actividad transcripcional de HIF-1.

#### **RESUMEN DE ANTECEDENTES:**

*Diversos estudios de nuestro laboratorio indican que la GTPasa Rab5 participa activamente en la progresión del cáncer al inducir la migración, invasión y metástasis en modelos celulares y murinos (in vivo). Además, recientemente encontramos que el estímulo de hipoxia (factor de mal pronóstico, progresión tumoral y resistencia a tratamientos) es capaz de activar a Rab5 incluso 3 veces más de lo observado en condiciones de normoxia, desencadenando un fuerte aumento de la capacidad migratoria, invasiva e incluso metastásica.*

*Un antecedente importante fue que el aumento de Rab5 activo no es producto de un aumento de los niveles de la proteína total; lo que nos llevó a pensar que posiblemente alguna(s) GEF(s) de Rab5 podría(n) estar involucrada(s) en el aumento de Rab5-GTP bajo condiciones de hipoxia. Por otro lado, existen varias GEFs de Rab5 que han sido implicadas en cáncer, como RIN1, RIN2, RIN3, RABEX-5 y ALS2, las cuales además poseen elementos de respuesta a la hipoxia (HREs) putativos en su secuencia genética.*

*Con todos los antecedentes anteriormente indicados, se plantea la siguiente hipótesis:*

#### **IV. HIPOTESIS**

*“La estabilización de HIF-1 $\alpha$  aumenta los niveles de Rab5-GTP mediante la inducción transcripcional de GEFs, promoviendo la migración e invasión tumoral en las líneas celulares A549 y RCC”*

#### **V. OBJETIVO GENERAL**

Dilucidar el mecanismo por el cual HIF-1 $\alpha$  induce la activación de Rab5 y probar si este mecanismo dependiente de GEFs es necesario para que las células tumorales promuevan la migración e invasión celular.

#### **VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Determinar si HIF-1 $\alpha$  induce la activación de Rab5, tanto por estímulos dependientes como independientes de hipoxia.
2. Identificar GEFs de Rab5 inducidas por hipoxia y determinar si esta inducción depende del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , tanto por estímulos dependientes como independientes de hipoxia.
3. Determinar si las GEFs inducidas por HIF-1 $\alpha$  participan en la activación de Rab5, promueven la migración y la invasión de células tumorales en hipoxia.

**Para organizar este escrito de manera lógica y secuencial, los resultados reportados en esta tesis son presentados en 3 secciones, cada una de las cuales responde a un objetivo específico enumerados de forma correlativa.**

## VII. METODOLOGÍA

### *Cultivo de celular*

Este estudio se llevó a cabo en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar de células alveolares humanas A549 y carcinoma renal humano de células claras RCC y RCC<sup>+vhl</sup>. Las células utilizadas se subcultivaron y mantuvieron en placas de cultivo de 10 y 6 cm de diámetro, con medio de cultivo DMEM alto en glucosa (#SH30243.01B, *Hyclone*), suplementado con 10% de suero bovino fetal (#11550356, *Gibco*) y con los antibióticos penicilina 10.000 U/mL y estreptomina 10 µg/mL (#30-002-CI, *Corning*). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

### *Hipoxia*

Las células A549 se subcultivaron con un 50% de confluencia 24 h antes de la hipoxia y en duplicado (normoxia e hipoxia). La hipoxia se realizó en una cámara hipóxica Billups-Rothenberg® (California, USA) por 6, 12 y 24 h, utilizando una mezcla de gases certificada, con un 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 94% N<sub>2</sub> (Linde AGA® Chile). El procedimiento se efectuó según las instrucciones del fabricante. Una vez sellada la cámara, se mantuvo en un incubador a 37°C por los períodos indicados previamente.

### *Amplificación y purificación de plasmidios*

Las secuencias codificantes de HIF-1α wt, HIF-1α (P402A/P564A) contenidas en los vectores pcDNA 3.1, se amplificaron en la cepa bacteriana Top ten de *Escherichia coli*, en el medio de cultivo Luria Bertani (LB) y purificados con el kit Midiprep PureLink® HiPure Plasmid Filter.

En primer lugar, las bacterias se resuspendieron y se homogenizaron en vórtex. Inmediatamente se realizó una lisis celular con dodecilsulfato de sodio (detergente que solubiliza las membranas externas de las bacterias, liberando el DNA genómico y plasmidial, denaturados por NaOH presente en la solución). Posteriormente se neutralizó con acetato potásico ácido, provocando una rápida renaturación del DNA plasmidial, quedando soluble en el sobrenadante, mientras el DNA genómico y la mayor parte de las proteínas precipitaron debido al tratamiento previo con SDS y a la alta concentración de sales. Posteriormente se efectuaron una serie de lavados mediante centrifugación, utilizando las columnas y la solución amortiguadora de lavado presente en el kit para eliminar contaminantes y sales que pudieran interferir con las técnicas posteriores.

Seguido de estos pasos, se llevó a cabo la cuantificación del DNA plasmidial utilizando el equipo Cytation® y se evaluó la integridad y tamaño en Kb del DNA plasmidial mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

### ***Transfección Celular***

Para el silenciamiento de HIF-1 $\alpha$ , se subcultivaron 600.000 y 1.000.000 de células en placas de 6 y 10 cm respectivamente, y se transfectaron con 10 nM de RNAs interferentes pequeños (siRNA) contra HIF-1 $\alpha$  (*mix de 3 siRNAs contra distintas secuencias de HIF-1 $\alpha$ ; sc-35561 Santa Cruz*) y su respectivo control (*sc-37007, Santa Cruz*), utilizando el reactivo de transfección Lipofectamina RNaimax (#13778075, *invitrogen*), ambos diluidos en Optimem (#31985088, *Gibco*). Por otro lado, se transfectaron 5 $\mu$ g de los plasmidios pcDNA 3.1 HIF-1 $\alpha$  Silvestre (WT), y la doble mutante no degradable pcDNA 3.1 HIF-1 $\alpha$  (P402A/P564A) más su control, el vector vacío pcDNA 3.1, utilizando el reactivo de transfección lipofectamina 2000 (#11668027, *Invitrogen*). Además, se utilizaron 100 nM de una mezcla de RNAs interferentes contra la GEF ALS2 (*mezcla de 3 secuencias con distintos blancos, sc-60154, Santa Cruz*) más su respectivo control.

### ***Ensayo de Pull-down***

Este ensayo es un método *in-vitro* usado para determinar los niveles de la fracción de Rab5 activa (Rab5-GTP). Esta metodología consiste en enriquecer un extracto con la fracción activa de Rab5, al incubar un homogenizado con la proteína de fusión constituida por la enzima Glutathion-S-Transferasa (GST), fusionada al motivo de unión a Rab5 activo, subclonado a partir de Rabaptina5, un efector de Rab5 que posee el dominio R5BD, capaz de unirse específicamente a Rab5 activo (GTP) (Saito *et al.*, 2002). Luego, las células se homogenizaron en una solución amortiguadora con HEPES 25 mM (pH 7.4), NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NP-40 1%, glicerol 10%, DTT 1 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas. Los extractos se incubaron por 5 minutos en hielo y centrifugados a 13.000 g durante 45 segundos a 4°C. Los sobrenadantes se utilizaron para ensayos de precipitación por afinidad utilizando 30  $\mu$ g de perlas de Glutathion-Sepharosa precubiertos con GST-R5BD por condición. Las perlas se incubaron con los sobrenadantes por 15 minutos a 4°C en un agitador rotatorio. Posteriormente, las perlas fueron colectadas y lavadas 3 veces con una solución amortiguadora conteniendo NP-40 al 0,01%. Finalmente, se solubilizó en solución amortiguadora de carga de proteínas Laemmli, y se incubaron a 100°C durante 5 minutos y luego se separaron mediante SDS-PAGE para análisis por Western blot.

### ***Western blot y anticuerpos***

Los diferentes extractos proteicos se cargaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separar las proteínas en función de su peso molecular mediante electroforesis. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para corroborar que la transferencia fue exitosa, la membrana se tiñó por 5 minutos con Rojo Ponceau.

Luego de la transferencia, se realizó el bloqueo de la membrana de nitrocelulosa con gelatina al 5% en TBS más 0,1% de Tween-20, con el objetivo de evitar que los anticuerpos se unan de forma inespecífica. A continuación, se incubó la membrana con los anticuerpos primarios anti-Rab5 de ratón (1:500 #sc-46692, Santa cruz) y anti-actina de conejo (1:20.000 #A3854, *Sigma*) utilizado como control de carga. Además se utilizaron los anticuerpos anti-HIF-1 $\alpha$  (1:2000 #610959, *BD Transduction Laboratories*<sup>TM</sup>), Anti-HIF-1 $\alpha$  grado ChIP policlonal de conejo (#ab2185, *ABCAM*), Anti-ALS2 monoclonal de conejo (1:15.000 #ab170896, *ABCAM*).

Los anticuerpos se incubaron por toda la noche a 4°C en agitación suave y constante. Posteriormente, se realizaron lavados con buffer TBS más 0,1% de Tween-20 (3 lavados de 5 minutos cada uno) y se incubaron con los anticuerpos secundarios (anti-conejo y anti-ratón 1:5000), que contienen conjugada la enzima peroxidasa de rábano picante, que reacciona con el sustrato luminol/peróxido en concentraciones de 1:1 emitiendo una señal quimioluminiscente, la cual visualizó y fotodocumentó utilizando el equipo Amersham Imager 600®.

### ***Densitometría (cuantificación de píxeles)***

Las fotografías producto del Western Blot, se analizaron mediante densitometría sobre las bandas obtenidas, utilizando el software UN-SCAN-IT®. El valor obtenido corresponde a los píxeles de cada banda seleccionada, proporcional a la intensidad de la señal (y por lo tanto a la cantidad de proteína en la muestra) menos el background. Los datos obtenidos se normalizaron por la cuantificación del control de carga actina o Rab5 total.

### ***Análisis in-silico de posibles blancos del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$***

Mediante análisis computacional (*in-Silico*) de las secuencias génicas completas de las GEFs de Rab5 obtenidas de la base de datos [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/) (Gen: RIN1 ENSG00000174791, Gen: RIN2 ENSG00000132669, Gen: RIN3 ENSG00000100599, Gen: RABEX-5 ENSG00000154710, Gen: ALS2 ENSG00000003393). Se identificaron sus secuencias



nucleotídicas promotoras e inicio del sitio de la transcripción (+1). Finalmente, se identificaron y cuantificaron las secuencias consenso (HREs) de HIF-1.

### ***Extracción y purificación de RNA total***

El RNA total fue extraído utilizando TRIZOL® (Invitrogen, Life Technologies) desde células A549, RCC, RCC<sup>+vhl</sup>, crecidas en placas de cultivo de 60 mm. Posterior a la homogenización con TRIZOL, se agregó cloroformo, el cual divide los componentes celulares en una capa superior acuosa que contiene el RNA, una fase intermedia y una fase inferior roja que contiene las proteínas y DNA. Luego el RNA fue precipitado con isopropanol y lavado con etanol 75% para eliminar impurezas. Finalmente, el RNA se resuspendió con 50 µL de agua libre de nucleasas.

### ***Tratamiento con DNAsa y obtención de cDNA a partir de RNA total***

Todo el RNA se sometió a un tratamiento con el Kit DNAsa de Promega®, incubando las muestras con la enzima DNAsa por 30 minutos a 37°C. Luego, la actividad de la enzima se detuvo con una solución STOP presente en el kit. Posteriormente, el RNA total se cuantificó y se determinó su pureza mediante la medición de absorbancias en una longitud de onda de 260 nm y 280 nm, utilizando la razón  $260/280 = 1.8 - 2$ , mediante el lector de microplacas Cytation, el cual utiliza 2 µL de muestra para realizar ambos procesos sin la necesidad de que la muestra sea diluida.

Posteriormente, se preparó la reacción de master mix 2x para realizar la transcripción reversa (RT) con un volumen final por muestra de 10 µL utilizando la solución amortiguadora 10x RT, dNTPs mix 100 mM, partidores aleatorios 10x y agua libre de nucleasas. Luego se prepararon 2 µg de RNA en 10 µL de agua libre de nucleasas, y se mezcló con 10 µL de la reacción de RT, los que fueron incubados a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 84°C por 5 minutos y finalmente a 4°C para obtener cDNA como indica el protocolo del fabricante (Applied Biosystem®).

### ***PCR en tiempo real (qRT-PCR)***

Posterior a la síntesis de cDNA correspondiente a las diferentes condiciones celulares, se realizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando el equipo Applied Biosystem más el reactivo Sybr green (Life Technologies), calculando posteriormente la abundancia relativa de los genes utilizando el método  $\Delta\Delta C_t$ .

### ***Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)***

Se utilizaron células A549 con un 100% de confluencia en placas de 10 cm, previamente incubadas en normoxia e hipoxia por 24 h. Posterior al tiempo de incubación, las células se fijaron en formaldehído al 1% en PBS (#28906, *Thermo Scientific*) por 10 minutos y se detuvo con 0,125 M de glicina, luego, las células se precipitaron a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en una solución amortiguadora de lisis (50 mM Hepes pH 7,8, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 0,1% NP-40 y 1x inhibidores de proteasas). Las células se rompieron con disgregación mecánica utilizando pistilo de vidrio, dando 60 golpes para separar núcleos de citoplasma, lo cual fue comprobado mediante tinción con tripan blue. Posterior a la disgregación, las muestras celulares se centrifugaron y los núcleos se resuspendieron en una solución amortiguadora de sonicación (50 mM Hepes pH 7,8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% Deoxicolato de Sodio, 0,1% SDS y 1x de inhibidores de proteasas). Posteriormente se realizó la fragmentación de cromatina utilizando 3 pulsos de sonicación a potencia media por 10 minutos, con intervalos de 30 segundos de sonicación más 30 segundos de descanso para generar fragmentos de 200 a 500 pb. A continuación, se realizó el tratamiento con proteinasa K por 1 h a 50°C. Además, se realizó un preaclaramiento con IgG normal, y los anticuerpos primarios contra HIF-1 $\alpha$  grado ChIP y se incubaron por toda la noche. Al otro día, se capturó el complejo DNA/proteína y se agregó proteína A/G. Luego, se realizó la purificación de DNA utilizando la mezcla fenol-cloroformo : alcohol isoamílico (1:27) para finalmente, cuantificar el nivel de enriquecimiento de HIF-1 $\alpha$  mediante qPCR utilizando los partidores descritos en anexos ([Tabla S3](#)).

### ***Ensayo de migración celular por transwell***

El primer día, se sembraron 600.000 células en placas de 6 cm. Al otro día, se tripsinizaron y centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. El precipitado celular se homogenizó con 2 mL de DMEM libre de suero y se sembraron 40.000 células dentro de los transwells (Transwell Costar, 6,5 mm de diámetro, 8  $\mu$ m de tamaño de poro), los cuales fueron precubiertos 24 h antes con 2  $\mu$ g/mL de fibronectina. Posteriormente, se agregó DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal en el compartimento inferior del transwell (placa 24 pocillos), el cual fue utilizado como quimioatrayente y las células se dejaron migrar por 1 h. Finalmente, los transwell se limpiaron y tiñeron con cristal violeta por 1h. Al otro día se realizó el conteo celular tomando 5 microfotografías por campo 10x y se calculó el promedio de 3 experimentos independientes.

### ***Ensayo de invasión celular en cámara Boyden***

La invasión celular se determinó a través de ensayos en cámara Boyden de matrigel de acuerdo a las instrucciones del fabricante (#354480, *BD Biosciences*). El fondo de los matrigeles fueron cubiertos con fibronectina a una concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$ . Posteriormente, las células fueron resuspendidas en medio libre de suero y se sembraron dentro del matrigel cubierto con fibronectina para migrar hacia el fondo del inserto, donde se agregó medio suplementado con 10% de suero bovino fetal. Luego de 24 h de incubación, los matrigeles se removieron y se lavaron, para luego teñirlos con solución de azul de toluidina 1% en metanol. Las células que migraron se cuantificaron en un microscopio invertido tomando 5 microfotografías por campo 10x y se calculó el promedio de 3 experimentos independientes.

### ***Análisis estadístico***

El análisis estadístico de todos los experimentos planteados se realizó con al menos 3 experimentos independientes. Para estimar las diferencias estadísticas de 2 condiciones distintas, se utilizó el test de t no paramétrico con la corrección de Mann Whitney, utilizando el programa GraphPad Prism 6, San Diego, CA. Para comparar más de 2 condiciones experimentales diferentes, se utilizó el método one way ANOVA no paramétrico con la corrección de Kruskal Wallis. Para ambos análisis, se consideró una significancia estadística un valor  $p < 0,05$  (intervalo de confianza 95%).

## VIII. RESULTADOS

### **1. Determinar si HIF-1 $\alpha$ induce la activación de Rab5, tanto por estímulos dependientes como independientes de hipoxia.**

Previamente en Silva *et al.*, 2016, evidenciamos que la hipoxia de 24 h aumenta la activación de Rab5 (Rab5-GTP), desencadenando un incremento de la migración e invasión celular (Silva et al., 2016). Esta situación nos llevó a estudiar si el aumento de los niveles de Rab5-GTP serían dependientes de la expresión de HIF-1 $\alpha$ , el cual se estabiliza en hipoxia de forma canónica.

Para aclarar esta interrogante, decidimos utilizar diferentes estrategias experimentales para interferir con la expresión de HIF-1 $\alpha$  y también con su actividad. La desestabilización de HIF-1 $\alpha$  se realizó bajo condiciones de hipoxia (1% de oxígeno) y también en normoxia (21% de oxígeno) por 24 h.

#### ***1.1 El aumento de Rab5-GTP en hipoxia es dependiente de HIF-1 $\alpha$***

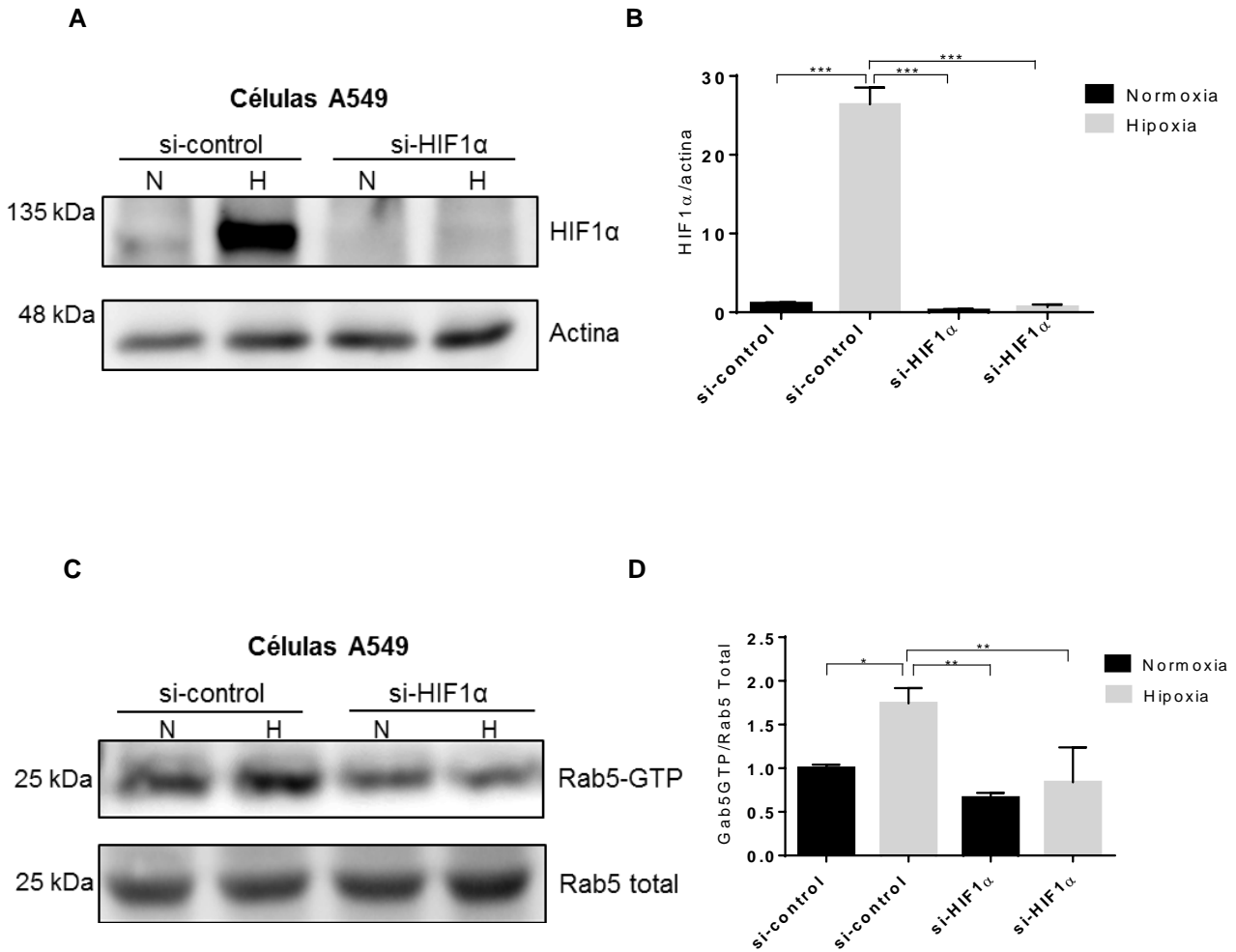
Como primera aproximación experimental, utilizamos RNAs pequeños de interferencia (siRNA) contra HIF-1 $\alpha$  (*mezcla de 3 siRNAs contra distintas secuencias de HIF-1 $\alpha$ ; sc-35561 Santa Cruz*) y su respectivo control (*sc-37007, Santa Cruz*) en células A549. En primer lugar, se realizó una curva dosis-respuesta para obtener la mejor eficiencia de transfección, utilizando los siRNAs a concentraciones de 10, 50 y 100 nM. Luego de 16 h de transfección, las células A549 fueron incubadas en hipoxia por 24 h y posteriormente, se realizó la técnica de western blot para cuantificar los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  y actina (utilizada como control de carga). Los resultados obtenidos mostraron que en todas las concentraciones evaluadas para la condición control (siRNA-control), la hipoxia fue capaz de aumentar la expresión de HIF-1 $\alpha$ ; mientras que en las células transfectadas con siRNA-HIF-1 $\alpha$ , se observó casi un 100% de silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  en condiciones de hipoxia en todas las concentraciones de siRNA evaluadas (10, 50 y 100 nM) ([ver anexo, figura S1](#)). De esta forma, se decidió utilizar la concentración de 10 nM en condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h, como se observa en la [figura 7A](#) y su respectiva cuantificación de 3 experimentos realizados de forma independiente ([figura 7B](#)).

Luego de estandarizar y validar la óptima concentración para la transfección, evaluamos los niveles de Rab5-GTP. Para esto, luego de 16 h de transfección con los siRNAs, las células A549 se incubaron en hipoxia y normoxia por 24 h. Luego, de forma inmediata se realizó la lisis celular y, mediante la

técnica de pull-down (ver materiales y métodos), se cuantificaron los niveles de Rab5-GTP y Rab5 total, encontrando que las células siRNA-control incubadas en hipoxia, poseen altos niveles de Rab5-GTP en comparación a aquellas células expuestas a normoxia. Además, de forma importante, se observó que las células siRNA-HIF-1 $\alpha$  incubadas en hipoxia, presentaron una disminución significativa en la activación de Rab5, como se observa en la [figura 7C](#). La [figura 7D](#) refleja el promedio de 3 experimentos independientes.

Además, en las condiciones estudiadas previamente, se cuantificaron los niveles totales de Rab5, sin evidenciar cambios significativos. Esto demuestra que el mecanismo de acción de HIF-1 $\alpha$  no interfirió con los niveles de la proteína total, sino que solo provocó el aumento de la fracción activa de Rab5 en hipoxia (ver anexo, [figura S3A](#)).

Para descartar un efecto inespecífico de los siRNAs, es decir que causen la disminución de la expresión, pero de otros genes que posean una secuencia similar a las reconocidas por los siRNAs contra HIF-1 $\alpha$ , utilizamos las células A549 transducidas con RNAs interferentes de horquilla pequeña contra HIF-1 $\alpha$  (*A549 sh-HIF-1 $\alpha$* ), más su respectivo control (*A549 sh-control*), incubadas en hipoxia y normoxia por 24 h (ver anexo, [figura S2A](#), control de la transfección). Posteriormente, se realizó la técnica de pull-down y se demostró que las células A549 shRNA-control en hipoxia muestran un aumento significativo en los niveles de Rab5-GTP en comparación a su contraparte, incubada en normoxia (ver anexo, [figura S2B](#)). Además, se demostró que las células A549 shRNA-HIF-1 $\alpha$  sometidas a hipoxia presentan una disminución de los niveles de Rab5-GTP, no significativa, en comparación a las células que expresan y estabilizan a HIF-1 $\alpha$  en hipoxia (*A549 sh-Control*) (ver anexo, [figura S2B](#)) (*Datos publicados en (Silva et al., 2016)*).



**Figura 7. El silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  disminuye los niveles de Rab5-GTP.** Las células A549 fueron transfectadas con 10 nM de siRNA control y siRNA contra HIF-1 $\alpha$  por 16 h y posteriormente, se incubaron en normoxia e hipoxia por 24 h. **(A)** El homogenizado celular se analizó mediante la técnica de western blot utilizando anticuerpos contra HIF-1 $\alpha$  y actina. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. **(B)** Los niveles de HIF-1 $\alpha$  y actina que fueron previamente cuantificados y normalizados contra la condición siRNA-Control en normoxia. **(C)** Los niveles de Rab5-GTP se midieron utilizando la técnica de pull-down, se muestra una imagen representativa de los niveles de Rab5-GTP y Rab5 total de 3 experimentos independientes **(D)** La gráfica indica el promedio de las veces de aumento de Rab5-GTP. Los análisis estadísticos fueron realizados con el test one-way ANOVA. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). **Figuras (A), (B) y (C) se modificaron de (Silva et al., 2016).**

## ***1.2 La inhibición de la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$ disminuye los niveles de Rab5-GTP inducidos por la hipoxia celular.***

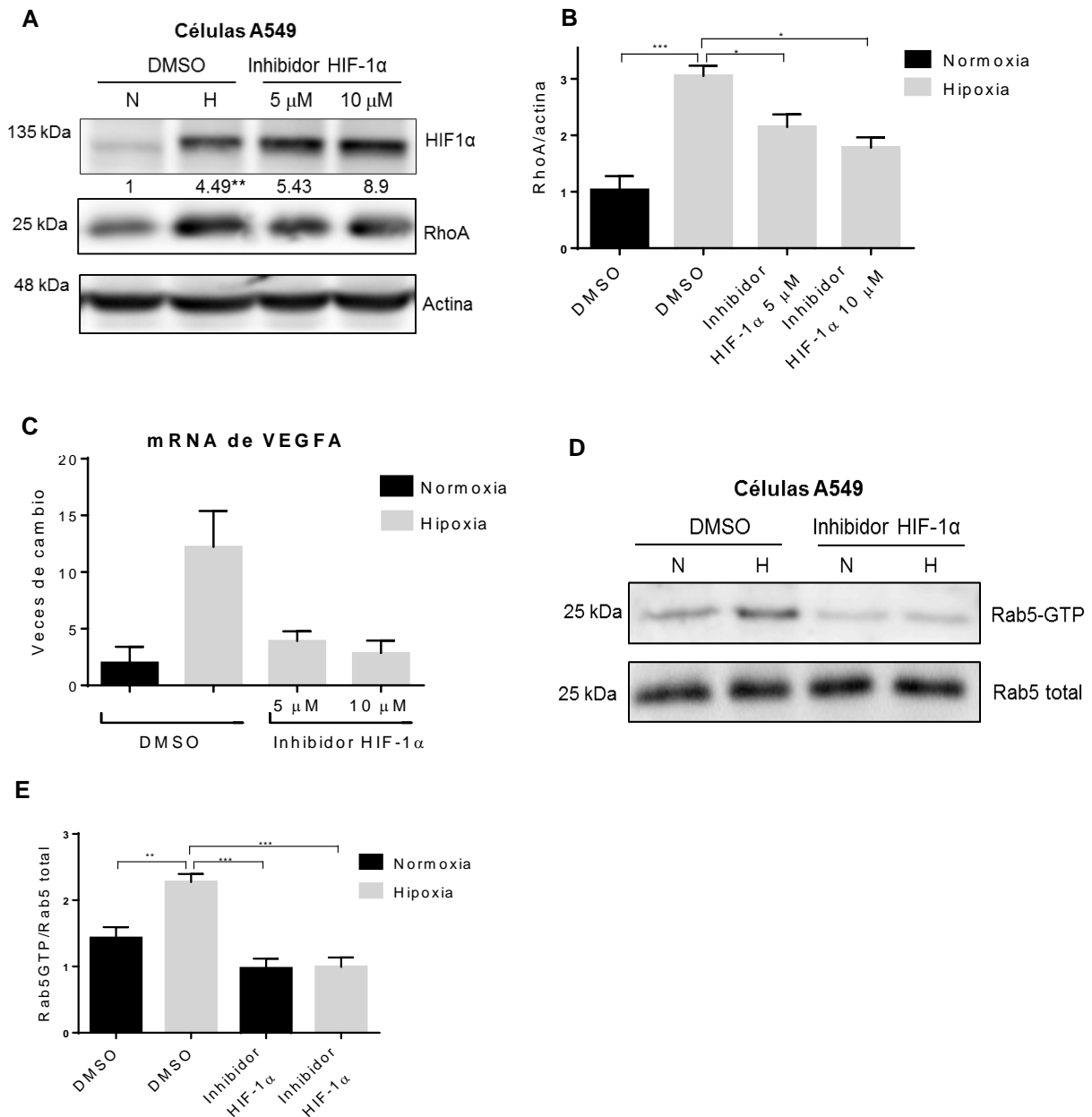
Posteriormente, se decidió intervenir farmacológicamente con la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  usando el compuesto C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub> (sc-205346, *Santa Cruz*), descrito como un inhibidor selectivo que no afecta la expresión de HIF-1 $\alpha$  en hipoxia, sino que inhibe el reclutamiento de co-activadores de la transcripción que promueven la expresión de los genes blancos de HIF-1 $\alpha$  (Yu *et al.*, 2017). Lo anterior, se pensó con el objetivo de dilucidar si la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  sería la responsable del incremento de los niveles de Rab5-GTP por hipoxia.

Para ello, las células A549 se incubaron con 2 concentraciones distintas del inhibidor (5 y 10  $\mu$ M), según lo descrito previamente (Hu *et al.*, 2017), más su respectivo control (DMSO); ambas en normoxia e hipoxia por 24 h. Para observar la efectividad de este inhibidor, se usaron 2 estrategias experimentales, la primera de ellas basada en la evaluación del nivel proteico de RhoA, GTPasa descrita como blanco transcripcional de HIF-1 $\alpha$  (Gilkes *et al.*, 2014). Como se observa en la [figura 8A](#), HIF-1 $\alpha$  se estabiliza durante la hipoxia en células tratadas con DMSO, al mismo tiempo que se observa un aumento en los niveles proteicos de RhoA, en comparación a lo observado en normoxia. Además, al continuar con el análisis, se observó que la inhibición de la actividad de HIF-1 $\alpha$ , previene el aumento de RhoA en hipoxia, sobre todo al utilizar 10  $\mu$ M del inhibidor ([ver figura 8A y gráfica 8B](#) de 3 experimentos independientes).

Como segunda estrategia para validar la efectividad del inhibidor, se midieron los niveles de RNA mensajero (mRNA) de VEGFA, un blanco transcripcional canónico de HIF-1 $\alpha$  (Hu *et al.*, 2017) por RTqPCR. Posterior al análisis de 2 experimentos independientes, se observó que las células tratadas con el vehículo control (DMSO) en hipoxia, experimentan un aumento de más de 10 veces del mRNA de VEGFA en comparación a los niveles observados en normoxia ([ver figura 8C](#)), mientras que el tratamiento con el inhibidor de HIF-1 $\alpha$  evitó este aumento a concentraciones de 5 y 10  $\mu$ M. Por lo tanto, con ambos resultados (RhoA a nivel proteico y VEGFA a nivel mRNA), se puede concluir que la concentración del inhibidor 10  $\mu$ M fue la dosis con mejores resultados.

Utilizando 10  $\mu$ M del inhibidor en normoxia e hipoxia por 24 h, se midieron los niveles de Rab5-GTP mediante pull-down, observando que en todos los experimentos realizados, las células A549 tratadas con el inhibidor de HIF-1 $\alpha$  en hipoxia presentaron una disminución importante y significativa de los niveles de Rab5-GTP en comparación a las células que poseen HIF-1 $\alpha$  activo ([figura 8D y E](#)).

De esta forma, se puede concluir que el aumento de los niveles de Rab5-GTP por hipoxia, son dependientes de la expresión y actividad del factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 $\alpha$ .



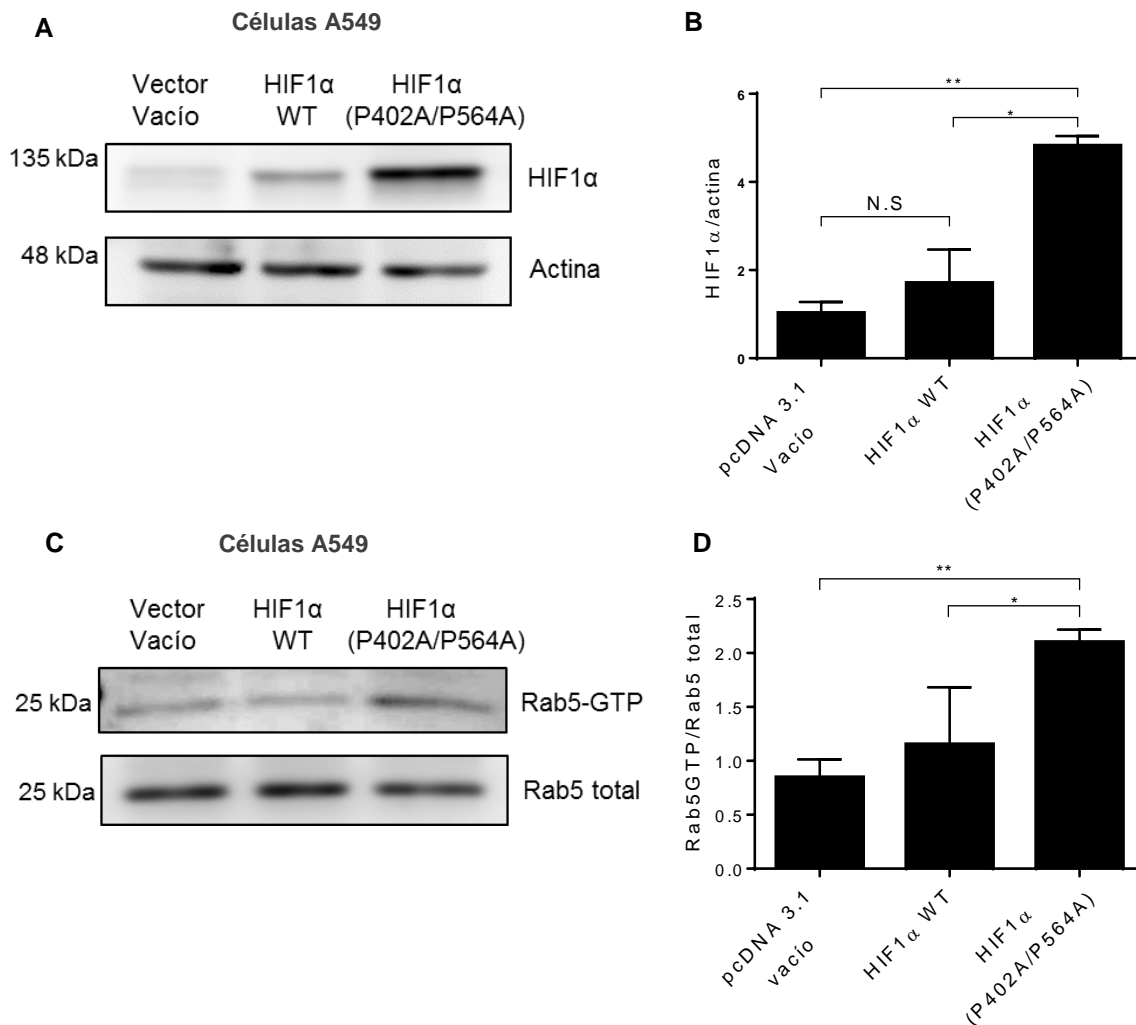
**FIGURA 8. La inhibición farmacológica de la actividad de HIF-1 $\alpha$  previene el aumento de los niveles de Rab5-GTP frente a hipoxia.** Células A549 se incubaron en normoxia e hipoxia por 24 h en presencia del vehículo DMSO (control) o el inhibidor de HIF-1 $\alpha$  (5 y 10  $\mu$ M). **(A)** El extracto proteico se analizó con los anticuerpos anti-HIF-1 $\alpha$ , RhoA (control +) y actina como control de carga. Los números bajo el panel indican las veces de aumento de HIF-1 $\alpha$  sobre el control. En **(B)** Se observa la cuantificación de los niveles de HIF-1 $\alpha$  sobre el control actina. **(C)** Se observa la gráfica correspondiente a la cuantificación de los niveles de mRNA de VEGFA (control +), utilizando actina como normalizador. **(D)** Los niveles de Rab5-GTP se midieron con la técnica de pull-down, como se muestra en la imagen representativa y se normalizaron con los niveles de Rab5 total. **(E)** La gráfica indica el promedio de las veces de aumento de Rab5-GTP. Los análisis estadísticos fueron realizados con el test one-way ANOVA. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



### ***1.3 La expresión ectópica de HIF-1 $\alpha$ provoca un aumento de Rab5-GTP en normoxia***

Para evaluar si la estabilización de HIF-1 $\alpha$  independientemente de la hipoxia celular, es suficiente para aumentar los niveles de Rab5-GTP, las células A549 fueron transfectadas de forma transitoria con los plasmidios codificantes para una doble mutante no degradable de HIF-1 $\alpha$  (P402A/P564A), más su respectivo control vector vacío (pcDNA 3.1) y HIF-1 $\alpha$  silvestre (WT) en normoxia. Previamente, se estandarizaron los tiempos de transfección iniciando la homogenización celular a las 24 y 48 h post-tratamiento (informe Unidad de Investigación N°2, *datos no mostrados*); en donde se definió 24 h como un tiempo suficiente para obtener una expresión significativa de HIF-1 $\alpha$ . Posterior a 24 h de transfección ([figura 9A](#)), se realizó la técnica de pull-down y se observó que las células que expresan la mutante no degradable de HIF-1 $\alpha$  (P402A/P564A), son capaces de aumentar de forma significativa la fracción activa de Rab5 en comparación a los niveles registrados en las condiciones control (vector vacío) y la condición con baja estabilidad de HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$  WT) ([ver figura 9B y 9C](#)).

Para complementar estos resultados de expresión de HIF-1 $\alpha$  en normoxia, decidimos evaluar si la estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$ , también en normoxia, es suficiente para activar a Rab5 utilizando el modelo de células RCC y RCC<sup>+vhl</sup>.

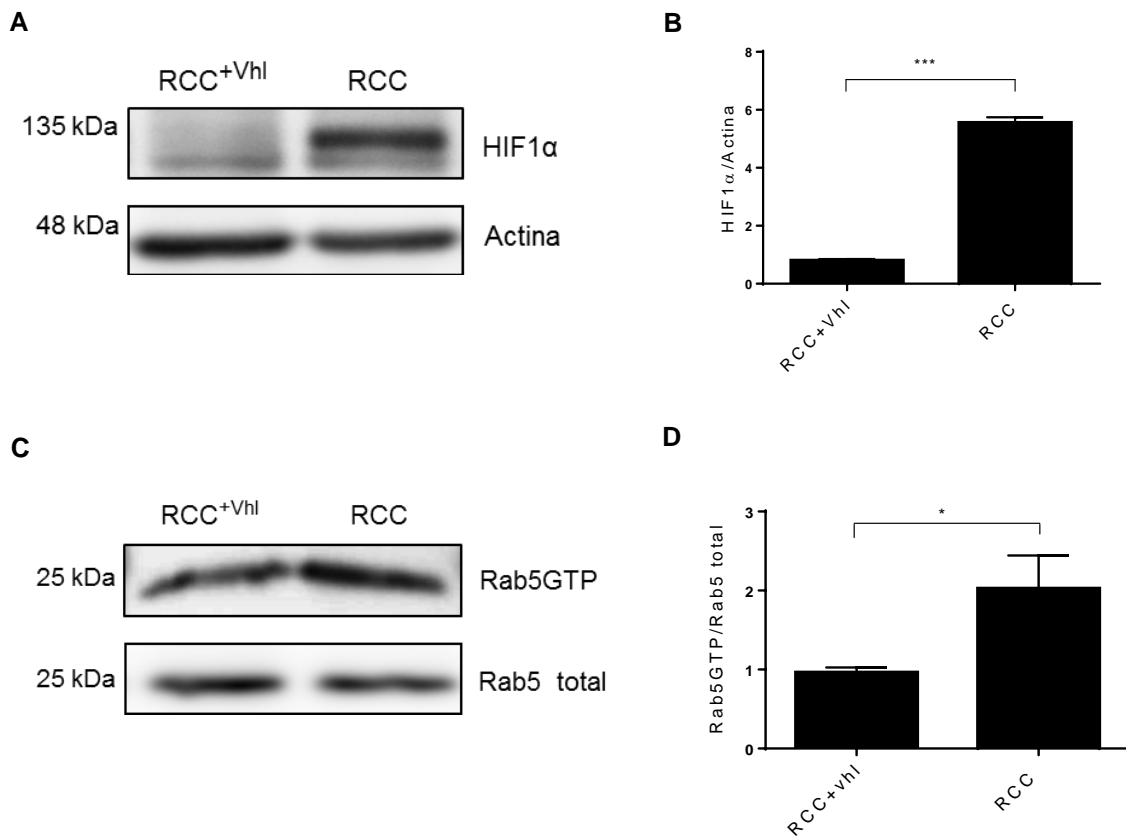


**Figura 9. La estabilización ectópica de una mutante no degradable de HIF-1 $\alpha$  aumenta los niveles de Rab5-GTP en normoxia.** Células A549 fueron transfectadas por 24 h con los plasmidios codificantes para HIF-1 $\alpha$ /WT, HIF-1 $\alpha$  (P402A/P564A) y un vector vacío (pcDNA3.1). **(A)** Western blot representativo de los niveles de HIF-1 $\alpha$  y actina **(B)** Cuantificación de los niveles de HIF-1 $\alpha$  sobre el control de actina. **(C)** Inmuntetección representativa de los niveles de Rab5-GTP obtenidos mediante la técnica de pull-down. **(D)** Cuantificación de los niveles de Rab5-GTP sobre el control de Rab5 total. Los resultados mostrados en **(B)** y **(D)** muestran los promedios de 3 experimentos independientes normalizados  $\pm$  el error estándar. Los análisis estadísticos fueron realizados con el test one-way ANOVA. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

#### **1.4 La línea celular de carcinoma renal RCC estabiliza de forma endógena a HIF-1 $\alpha$ y posee altos niveles de Rab5-GTP**

La línea celular de carcinoma renal de células claras (RCC) se caracteriza por estabilizar de forma endógena las subunidades HIF-1 $\alpha$  debido a la presencia de una mutación genética que inactiva la función del supresor de tumores VHL, el cual es requerido para la degradación proteosomal de HIF-1 $\alpha$  (Wang & Semenza, 1995). A modo comparativo, utilizamos la línea celular  $RCC^{+vhl}$ , la cual ha sido reconstituida con VHL silvestre, permitiendo la degradación constante de HIF-1 $\alpha$ . Como se observa en la [figura 10A](#), las células RCC poseen niveles significativos de HIF-1 $\alpha$  en comparación a las células  $RCC^{+vhl}$  ([gráfica 10B](#)).

Posterior a la evaluación de los niveles de HIF-1 $\alpha$ , se midieron los niveles de Rab5-GTP utilizando la técnica de pull-down, hallándose que las células RCC expresan mayores niveles de Rab5-GTP en comparación a lo observado en la condición  $RCC^{+vhl}$  ([figura 10C](#) y [gráfica 10D](#)).



**FIGURA 10. La estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$  aumenta los niveles de Rab5-GTP en la línea celular RCC y RCC<sup>+vhl</sup>.** Las células RCC y RCC<sup>+vhl</sup> crecieron a confluencia y se obtuvo un homogenizado celular. **(A)** Western blot representativo de los niveles endógenos de HIF-1 $\alpha$  y actina. **(B)** Cuantificación de los niveles de HIF-1 $\alpha$  y actina. **(C)** Niveles de Rab5-GTP se midieron con la técnica de pull-down, como se muestra en la imagen representativa. **(D)** La gráfica muestra el promedio normalizado con la expresión basal de RCC<sup>+vhl</sup>,  $\pm$  el error estándar de 5 experimentos distintos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el t-test student (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

## RESUMEN OBJETIVO N°1

*El trabajo de Silva y Cols del año 2016 (Silva et al., 2016), demostró que la hipoxia tumoral aumenta los niveles de Rab5-GTP, lo que promueve una mayor migración, invasión y metástasis de células tumorales en modelos in-vitro e in vivo respectivamente; pero no se investigó un mecanismo por el cual este evento sucede.*

*Por este motivo, en este trabajo de tesis se buscó una posible ruta de señalización, demostrando que la estabilidad y actividad de HIF-1 $\alpha$  en hipoxia, regulan el aumento de los niveles de Rab5-GTP (figuras 7D y 8D). Además, encontramos que la sola estabilización de HIF-1 $\alpha$ , independiente de la hipoxia, es suficiente para activar a Rab5, lo cual se demostró utilizando una mutante no degradable de HIF-1 $\alpha$  (P402A/P564A) y las células RCC. En ambos tratamientos independientes de la hipoxia celular, encontramos que los niveles de Rab5-GTP fueron significativamente mayores, como se resume en las figuras 9D y 10D. Además, al evaluar los niveles de Rab5 total, no observamos cambios significativos en todas las condiciones estudiadas (ver anexo, figura S3C).*

*De esta manera, en el primer objetivo concluimos que la estabilidad y actividad de HIF-1 $\alpha$  son requeridas para que Rab5 se active por hipoxia, lo cual no es producto de un aumento de los niveles de la proteína total.*

## **2. Identificar GEFs de Rab5 inducidas por hipoxia y determinar si esta inducción depende del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , tanto por estímulos dependientes como independientes de la hipoxia celular.**

En general, los factores de transcripción reconocen secuencias nucleotídicas cortas y conservadas dentro del promotor proximal de sus genes blancos, pudiendo aumentar o disminuir la transcripción, pero en el caso de HIF-1 $\alpha$ , gran parte de los estudios lo describen como un inductor de la transcripción, más que un represor (Eisinger-Mathason *et al.*, 2013, Erler *et al.*, 2006, Gilkes *et al.*, 2014, Hackenbeck *et al.*, 2011, Hu *et al.*, 2017, Ishikawa *et al.*, 2009, Kimura *et al.*, 2001, Krishnamachary *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2009, Ollerenshaw *et al.*, 2004, Pugh & Ratcliffe, 2003, Semenza, 1998, Sieck, 2013, Vaupel & Mayer, 2007, Xue *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2008, Yatabe *et al.*, 2004, Zieseniss, 2014).

En la [figura S3](#) (anexos), previamente demostramos que ni la hipoxia, ni HIF-1 $\alpha$  son capaces de modificar los niveles totales de Rab5. Este resultado anula la posibilidad de que HIF-1 $\alpha$  induzca la expresión de Rab5, ya que HIF-1 $\alpha$ , sólo aumentó y de forma significativa los niveles de Rab5-GTP.

La siguiente posibilidad a evaluar, fue que HIF-1 $\alpha$  esté induciendo la expresión de alguna(s) GEF(s) de Rab5, incrementando de esta forma los niveles de Rab5-GTP.

De esta manera, decidimos estudiar moléculas GEFs de Rab5, considerando sólo aquellas que posean HREs putativos en su secuencia génica y participen en algún evento tumoral.

### ***2.1 GEFs de Rab5 están involucradas en la progresión tumoral y contienen HREs putativos***

Como la hipoxia estabiliza a HIF-1 $\alpha$ , y este a su vez, aumenta los niveles de Rab5-GTP sin modificar los niveles de la proteína total, una posible explicación es que HIF-1 $\alpha$  se una a algún(os) HRE(s) dentro del promotor de alguna(s) molécula(s) GEF(s) de Rab5 y de esta forma, induzca un aumento de los niveles del RNA mensajero (mRNA) de una o varias GEFs.

Para abordar esta hipótesis, previamente se seleccionaron las GEFs de Rab5 utilizando 2 criterios de inclusión: **1.** Que sean GEFs descritas previamente en algún evento oncogénico documentado en la literatura y **2.** Que estas GEFs presenten uno o más elementos de respuesta a la hipoxia (HREs) dentro de su secuencia genética.

De esta forma, en base a estos criterios se seleccionaron las GEFs **RIN1** (Fang *et al.*, 2012), **RIN2** (Sandri *et al.*, 2012), **RIN3** (Janson *et al.*, 2012), **Rabex-5** (Wang *et al.*, 2014) y **ALS2** (Kunita *et al.*, 2007) como se muestra en el anexo, [figura S4](#) y [tabla S1](#).

## 2.2 Las GEFs de Rab5 RIN2, RIN3 y ALS2 son inducidas por hipoxia

Posterior a la selección de las GEFs, las células A549 se incubaron en normoxia e hipoxia por 6 y 12 h para luego cuantificar los niveles de mRNA mediante la técnica de RT-qPCR. Como control positivo, se cuantificaron los niveles de mRNA de VEGFA, el cual es un blanco canónico de HIF-1 $\alpha$  (Forsythe et al., 1996).

Luego de la amplificación de los distintos cDNAs, se realizó la técnica de qPCR y se observó un aumento significativo en la expresión de VEGFA a las 6 y 12h de hipoxia, en comparación con la condición de normoxia; pero por otro lado, no se observaron cambios significativos para las GEFs seleccionadas en estos períodos de tiempo (ver anexos, figura S5).

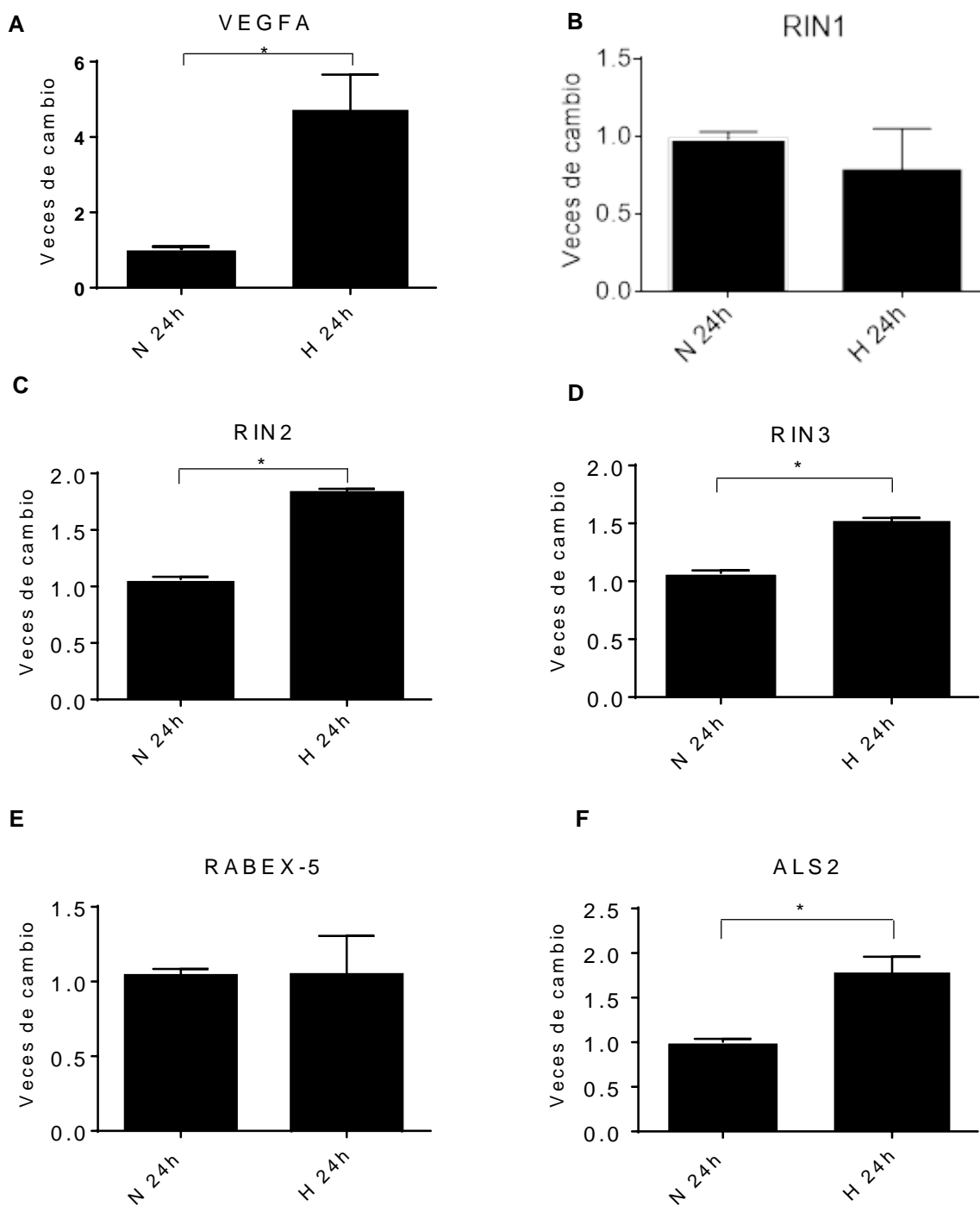
Debido a los resultados obtenidos, se decidió incubar las células en normoxia e hipoxia, pero esta vez por 24 h. De esta manera, se logró evidenciar que a las 24 h de hipoxia, existe un aumento significativo de los niveles de mRNA, tanto para el control positivo de VEGFA, como para las GEFs RIN2, RIN3 y ALS2 (ver figuras 11A-C-D-F respectivamente). Para profundizar más en este hallazgo, decidimos evaluar si los aumentos de los mRNAs de las GEFs RIN2, RIN3 y ALS2, eran dependientes de HIF-1 $\alpha$ .

Para abordar esta pregunta, se interfirió con la expresión de HIF-1 $\alpha$ , utilizando RNAs interferentes en condiciones de hipoxia y normoxia (estandarización previa en la figura 7A), y de manera alternativa, se usó la transfección transitoria con los cDNAs codificantes para HIF-1 $\alpha$  (figura 8A). Luego de realizar más de 5 repeticiones experimentales en cada caso, y realizar 3 experimentos utilizando modificaciones menores del protocolo inicial, no se obtuvieron resultados consistentes, reproducibles, ni significativos (ver anexo, figura S6). Por otro lado, también se decidió utilizar los plasmidios codificantes para HIF-1 $\alpha$ /wt y la mutante no degradable de HIF-1 $\alpha$  (P402A/P564A). Luego de la transfección por 24 h, se realizó la técnica de RTqPCR, y a pesar de que los últimos experimentos tenían menos variables (sólo condición normoxia), los resultados fueron nuevamente inconsistentes (ver anexo, figura S7). Posterior a 4 experimentos independientes, se decidió no continuar evaluando los niveles de mRNA en condiciones de transfección transitoria y se propuso otra estrategia experimental.

Estos resultados podrían ser atribuidos al estrés celular generado por los reactivos empleados en la transfección, sumado a las 24 h de incubación de hipoxia y normoxia, lo que podría influir en la correcta cuantificación (o incluso, degradación) de mRNAs. Previamente, otros investigadores ya han utilizado esta estrategia experimental (siRNAs contra HIF-1 $\alpha$  y posterior hipoxia), y sus resultados demuestran la necesidad de reproducir varias veces un mismo experimento para reducir el error estándar y alcanzar resultados significativos (Yang et al., 2008). Otra posibilidad es que la línea celular empleada sea más sensible a ciertos tratamientos y se vea fuertemente afectada la expresión

de algunos genes al realizar 16 h de transfección, seguida de 24 h de hipoxia. Por otra parte, el RT-qPCR es una técnica altamente sensible y cualquier traza de sal o reactivo podría afectar los resultados. No obstante, cabe señalar que se descarta una alteración de la integridad y pureza de los RNAs cuantificados ya que no se observaron problemas en la integridad de los RNAs mediante electroforesis en gel de agarosa (datos no mostrados), ni se evidenciaron problemas en la razón absorbancia 260/280, la cual incluso siempre dio como resultado valores entre 1,8 - 2,0 para los análisis realizados por RT-qPCR con excelentes concentraciones de RNAs.





**FIGURA 11. La hipoxia induce el aumento de los niveles de mRNA de RIN2, RIN3 y ALS2.** Células A549 se incubaron en hipoxia y normoxia por 24 h, inmediatamente se realizó la extracción y purificación de RNA y seguido de la técnica de RT-qPCR. **(A)** Cuantificación de la expresión de VEGFA, utilizado como control positivo. **(B)** Expresión de RIN1. **(C)** Expresión de RIN2. **(D)** Expresión de RIN3. **(E)** Expresión de Rabex-5 y **(F)** expresión de ALS2. Todas las veces de cambio se normalizaron con los niveles de actina utilizando la ecuación  $\Delta\Delta CT$ . La gráfica muestra el promedio de 4 experimentos independientes con sus respectivos errores estándar. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el t-test student (\*  $p < 0,05$ ).

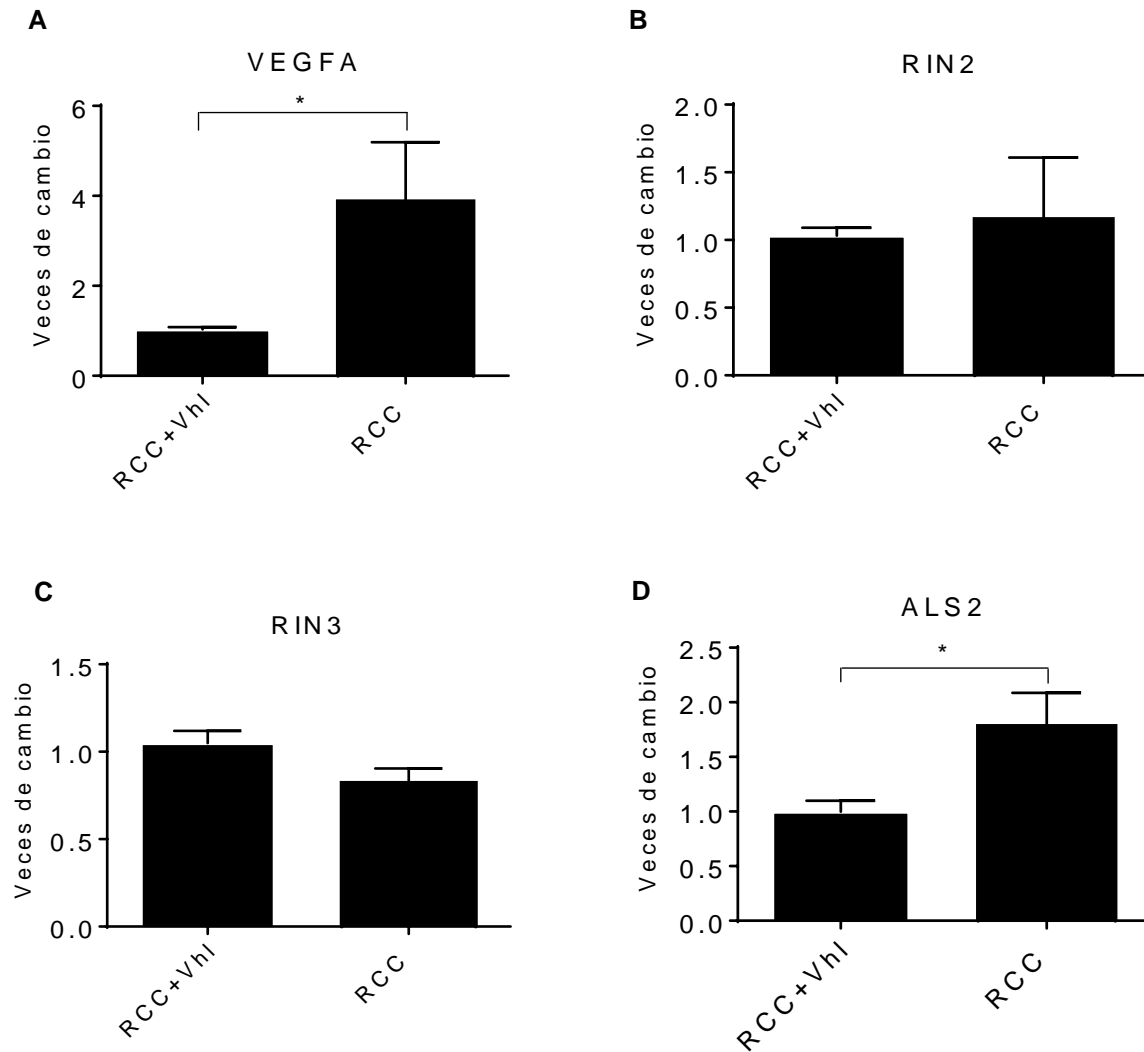
### ***2.3 La estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$ aumenta la expresión de la GEF de Rab5 ALS2***

Debido a las dificultades presentadas anteriormente, se decidió utilizar de manera complementaria la línea celular RCC y la sublínea RCC<sup>+vhl</sup> para evaluar mediante RT-qPCR, si la estabilización de HIF-1 $\alpha$  por sí sola induce la expresión de las GEFs de Rab5 en un modelo celular endógeno.

Luego de obtener el RNA, se realizó la técnica de RT-qPCR y se observó que las células RCC poseen niveles significativamente mayores de VEGFA (control) y además, se observó que la GEF de Rab5 ALS2 aumenta también de forma significativa, en comparación a los niveles observados en células RCC<sup>+vhl</sup> (figura 12A y D). Intrigantemente, no se observaron cambios significativos para las GEFs RIN2 y RIN3 (figura 12B y C), las cuales fueron previamente seleccionadas junto a ALS2 a partir de los resultados obtenidos en las células A549 en condiciones de hipoxia (figuras 11A, C, D y F).

En resumen, los resultados obtenidos con un modelo de hipoxia (A549) y de estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$  en normoxia (RCC), indican que la expresión de la GEF ALS2 pudiese estar siendo inducida tanto por hipoxia como por HIF-1 $\alpha$ .

Para evaluar si los cambios a nivel de mRNA se asocian a cambios a nivel de proteína, se procedió con los siguientes experimentos:



**Figura 12. La estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$  en la línea celular RCC está asociada al aumento de los niveles de mRNA de la GEF de Rab5 ALS2.** Las células RCC y RCC<sup>+vhl</sup> fueron crecidas a confluencia para extraer y purificar el RNA y realizar la técnica de RT-qPCR. En cada experimento se cuantificó **(A)** la expresión de VEGFA como control positivo **(B)** expresión de RIN2 **(C)** expresión de RIN3 y **(D)** expresión de ALS2. Todas las cuantificaciones se realizaron utilizando los niveles de actina como normalizador, utilizando la ecuación  $\Delta\Delta CT$ . La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos independientes con sus respectivos errores estándares. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el t-test student (\* p < 0,05).

#### ***2.4 HIF-1 $\alpha$ es necesario para aumentar los niveles proteicos de ALS2***

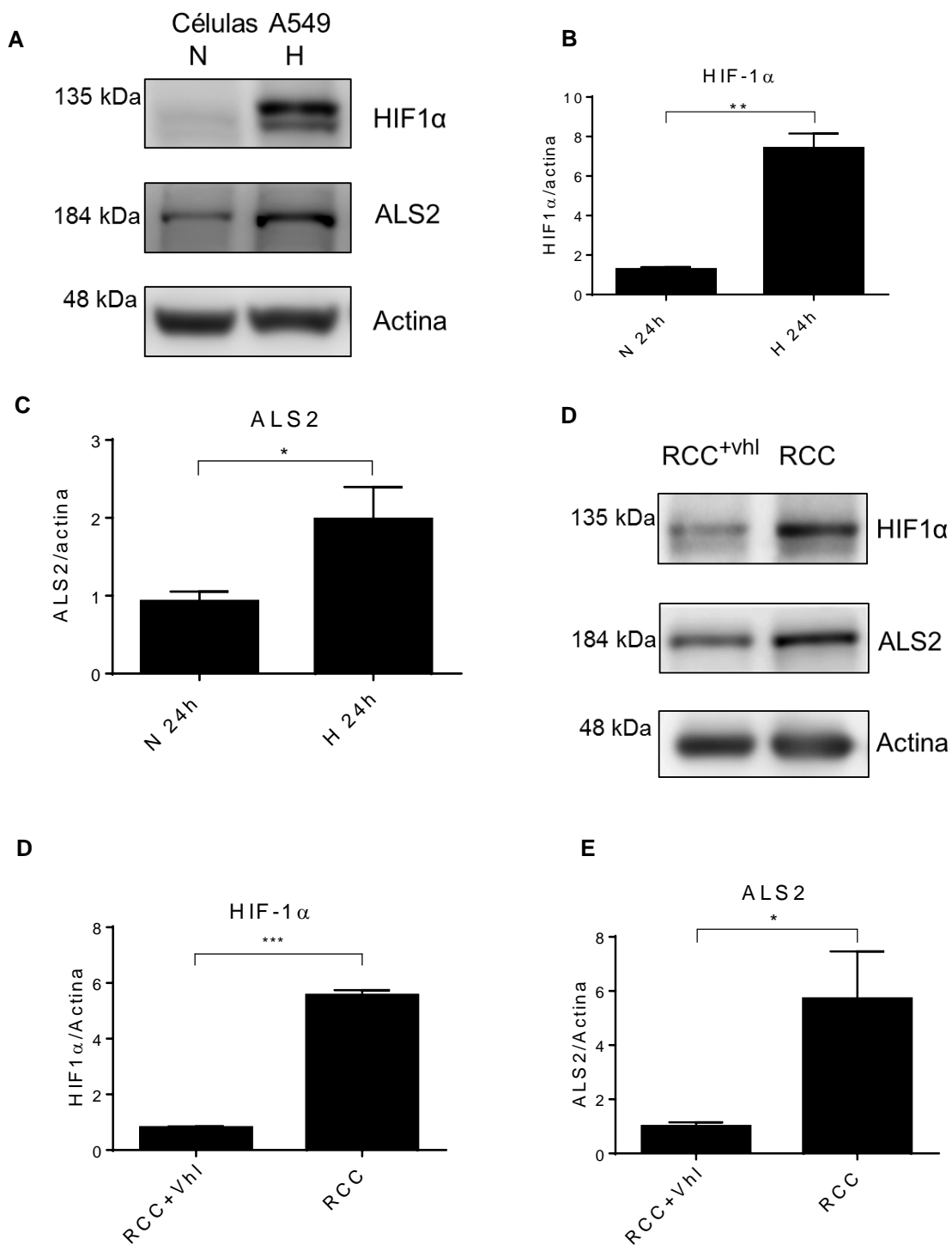
En primer lugar, se evaluaron los niveles proteicos de ALS2 y HIF-1 $\alpha$  en el modelo de hipoxia por 24 h utilizando las células A549. Como se observa en la [figura 13A y B](#), los niveles de HIF-1 $\alpha$  aumentaron producto de la hipoxia celular y además, se observó un aumento significativo de ALS2 ([figura 13A y 13C](#)).

En segundo lugar, para evaluar la dependencia de HIF-1 $\alpha$  en ausencia de hipoxia celular, se usaron las células RCC, las cuales presentan niveles significativos de HIF-1 $\alpha$  en normoxia, como se observa en la [figura 13D y E](#). Concordantemente, se encontró que esta línea celular posee altos niveles de ALS2, en comparación a los niveles cuantificados en las células RCC<sup>+vhl</sup>.

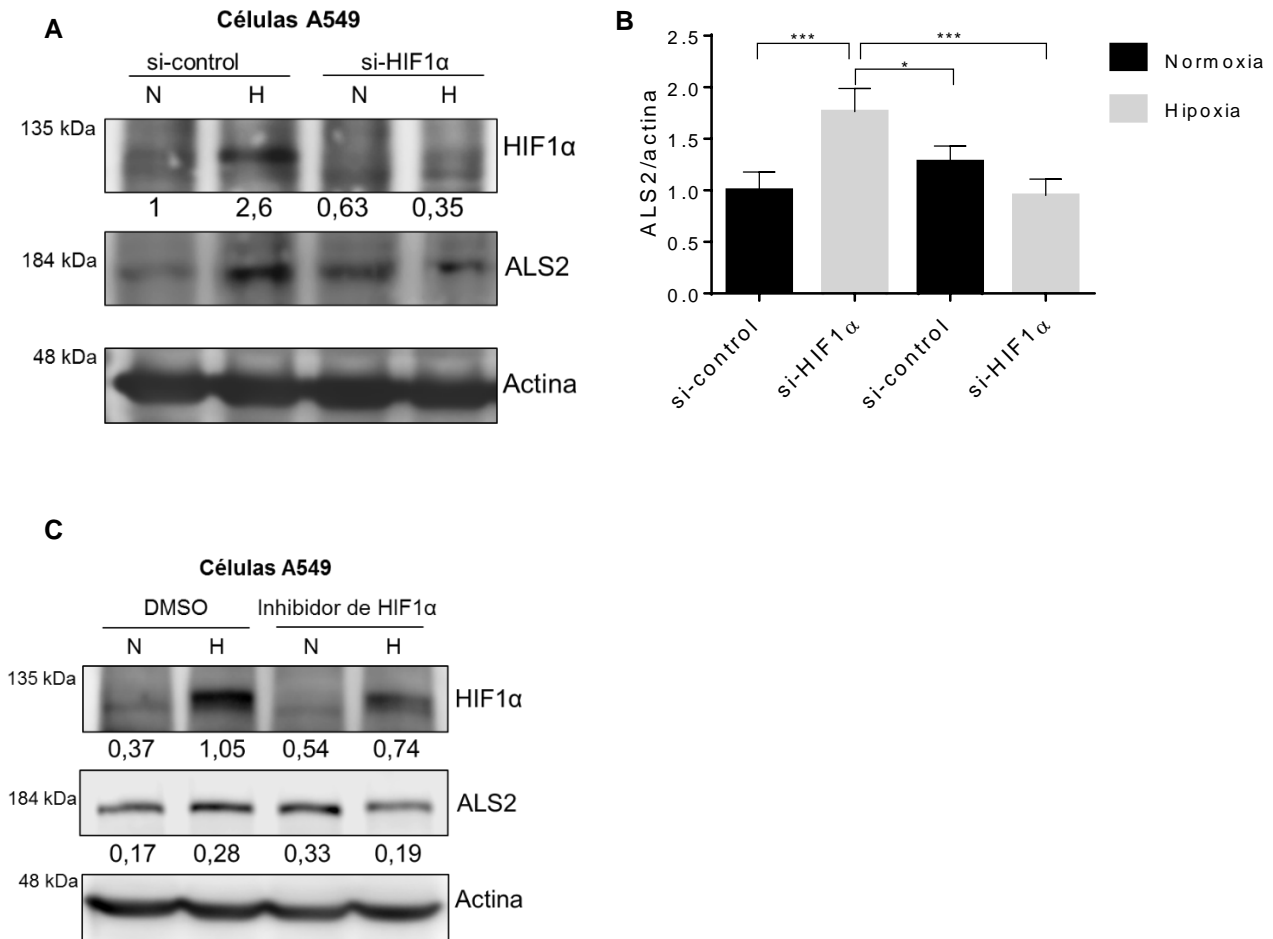
Estos resultados sugieren que el aumento de los niveles de ALS2 son dependientes de la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .

Lo anterior, es apoyado por ensayos de silenciamiento de HIF-1 $\alpha$ , en donde el tratamiento con siRNAs contra HIF-1 $\alpha$  redujo los niveles de ALS2 de forma significativa en condiciones de hipoxia ([Figura 14A y B](#)).

Finalmente, se decidió disminuir la actividad de HIF-1 $\alpha$  utilizando el inhibidor farmacológico de HIF-1 $\alpha$  (estandarizado previamente en la [figura 8A](#)) y se evaluaron los niveles proteicos de ALS2 como se observa en la [figura 14C](#), donde los niveles de ALS2 aumentaron en hipoxia, solamente en la condición control (vehículo DMSO), mientras que este aumento inducido en hipoxia, no se observó en presencia del inhibidor de HIF-1 $\alpha$  en hipoxia. Sin embargo, este dato es preliminar (N=1) y necesita ser apoyado por más determinaciones.



**Figura 13. La hipoxia y la estabilización de HIF-1α aumentan la expresión proteica de ALS2.** (A) Las células A549 se crecieron e incubaron en normoxia e hipoxia por 24 h y posteriormente se obtuvo el extracto proteico total para medir los niveles proteicos de HIF-1α, ALS2 y actina. (B) Cuantificación de los niveles de HIF-1α y actina. (C) Cuantificación de los niveles de ALS2 y actina. (D) Utilizando las células RCC y RCC<sup>+vhl</sup> a confluencia, se realizó la técnica de western blot donde se midieron los niveles proteicos de HIF-1α, ALS2 y actina. (E) Cuantificación de los niveles de HIF-1α y actina. (F) Cuantificación de los niveles de ALS2 y actina. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el t-test student (\* p < 0,05).



**Figura 14. La estabilización de HIF-1 $\alpha$  es requerida para la expresión de ALS2 en hipoxia.** (A) Se sembraron 600.000 células en placas de 60 mm. Al otro día, se transfectaron con 10 nM de siRNA-control y siRNA-ALS2. Luego de 16 h, las células se incubaron en normoxia e hipoxia por 24 h y se realizó la técnica de western blot para cuantificar los niveles de HIF-1 $\alpha$ , ALS2 y actina. Los números bajo el panel de HIF-1 $\alpha$  indican el promedio de las veces de aumento de HIF-1 $\alpha$  normalizados con actina. (B) Cuantificación de los niveles de ALS2 y actina. (C) Se sembraron 600.000 células en placas de 60 mm y al otro día se incubaron en normoxia e hipoxia con el vehículo DMSO y con 10  $\mu$ M del inhibidor de HIF-1 $\alpha$  por 24 h. Posteriormente, se realizó la técnica de western blot en ambas condiciones y se cuantificaron los niveles de HIF-1 $\alpha$ , ALS2 y actina (control de carga). Este experimento representa un N=1 y los números bajo cada panel corresponden a la cuantificación densitométrica. Los análisis estadísticos de A y B se realizaron con el test one-way ANOVA. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

En resumen, previamente en el primer objetivo, se demostró que el aumento de los niveles de Rab5-GTP inducidos por la hipoxia celular, eran inducidos por HIF-1 $\alpha$  y encontramos también, que la estabilización de HIF-1 $\alpha$  independientemente de la hipoxia celular, es capaz de aumentar los niveles de Rab5-GTP. Además, encontramos que este aumento pareciera no ser dependiente de una síntesis *de novo* de Rab5 total, ya que esta no cambia de forma significativa en las condiciones estudiadas. Por este motivo, decidimos indagar las GEFs de Rab5 relacionadas a tumorigenesis y que tuvieran HREs dentro de su secuencia génica. De esta forma, en el objetivo 2, se evaluaron las GEFs RIN1, RIN2, RIN3, ALS2 y Rabex-5. Luego de seleccionarlas, encontramos que solamente las GEFs RIN2, RIN3 y ALS2 aumentaron de forma significativa por la hipoxia. Posteriormente, se evaluó cual de ellas estaría siendo inducida en respuesta a la estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$  en normoxia (modelo celular RCC), y se observó un aumento exclusivamente de ALS2. Debido a estos resultados, utilizando las células A549, se procedió a silenciar a HIF-1 $\alpha$ , concluyendo luego de 4 experimentos independientes, que la expresión de ALS2 inducida por la hipoxia celular es dependiente de la estabilidad y actividad de HIF-1 $\alpha$ , dato que es apoyado por un experimento utilizando el inhibidor de HIF-1 $\alpha$ .

Al evidenciar que HIF-1 $\alpha$  induce la expresión de ALS2, un posible mecanismo sería que HIF-1 reconozca algún elemento de respuesta a la hipoxia (HRE) dentro del promotor de esta GEF y así, posteriormente promueva el reclutamiento de coactivadores de la transcripción, incrementando la expresión de ALS2.

Para aclarar esta interrogante, decidimos analizar el promotor de ALS2 y posteriormente realizar la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), (*Propuesta planteada durante el primer avance de tesis, puesto que esta estrategia experimental no fue planteada inicialmente en el proyecto*).

## **2.5 EL HRE proximal de ALS2 es un sitio susceptible a la transcripción**

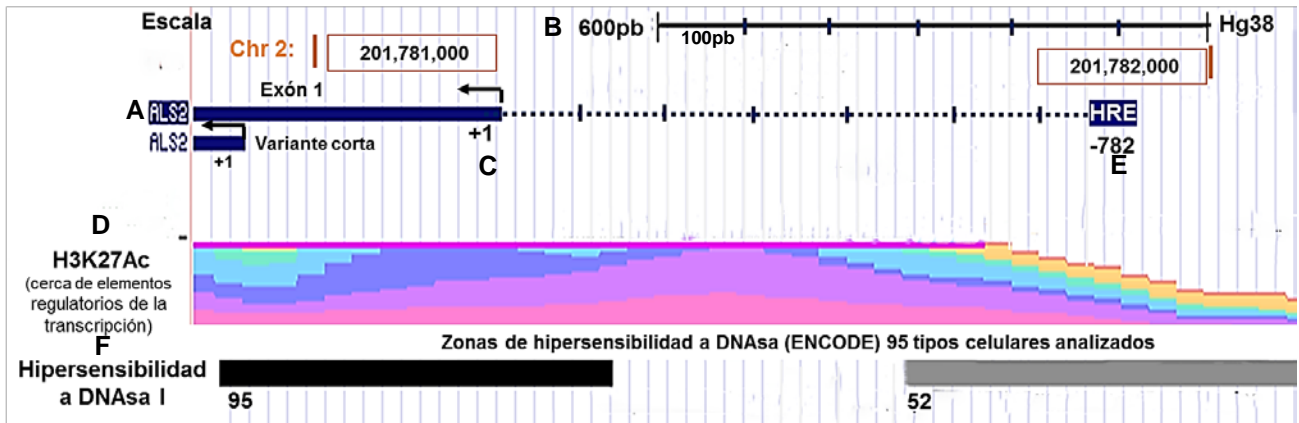
El elemento de respuesta a la hipoxia (HRE), es una región de unión para el factor de transcripción HIF-1, la cual es altamente conservada. Su secuencia consenso (5'-(A/G)CGTG-3') está presente en todos los genes blancos de HIF-1; como VEGFA (Forsythe *et al.*, 1996), TWIST (Yang *et al.*, 2008), MMP-9 (O'Toole *et al.*, 2008), MT1-MMP (Miyazaki *et al.*, 2008), RhoA (Gilkes *et al.*, 2014), CXCR4 (Ishikawa *et al.*, 2009), c-Met (Pennacchietti *et al.*, 2003) y CCR7 (Li *et al.*, 2009); entre otros (Liu *et al.*, 2012).

Previamente, el análisis *in-silico* demostró que ALS2 posee 3 HREs putativos en la región promotora del gen, siendo el HRE ubicado la posición -792 pb el más cercano al sitio de inicio de la transcripción (ver anexo, figura S4). Posteriormente, dado el posible potencial transcripcional de esta secuencia al contener HREs putativos, se procedió a indagar en la base de datos UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>), sobre posibles modificaciones epigenéticas, como acetilaciones e hipersensibilidad a DNAsa I, que den cuenta de una mayor susceptibilidad a la transcripción cercana al HRE proximal de ALS2 (-792 a -788 pb).

Lo anterior se realizó tomando en cuenta que las acetilaciones son modificaciones postraduccionales realizadas sobre el DNA por las enzimas acetiltransferasas de histonas (HAC). Las acetilaciones sobre el DNA favorecen la descondensación de la cromatina, facilitando así la unión de la maquinaria transcripcional al DNA (Li *et al.*, 2007). La acetilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Ac), es una de las marcas más utilizadas para encontrar sitios susceptibles a la transcripción (potenciadores activos) (Creyghton *et al.*, 2010).

En la figura 15, se muestra un análisis del promotor de ALS2, utilizando la base de datos Genome Browser. En la figura 15A, observa parte de la secuencia del gen de ALS2, ubicado aproximadamente entre los -782 y +100 pb (ver escala en la figura 15B). Otro aspecto importante para entender es la figura 15C, la cual muestra el +1 del sitio de inicio de la transcripción. En la figura 15D, se observa un diagrama representativo de los niveles de H3K27Ac en la secuencia de ALS2, representados por diversos montes y valles de colores, donde cada color corresponde a un modelo celular previamente estudiado. Esta representación muestra altos niveles de acetilación en la región cercana al HRE proximal de ALS2 (figura 15E). El esquema además, indica el estudio de hipersensibilidad a nucleasas (rectángulos grises y negros), indicados en la figura 15F. Las regiones del genoma que han sido descritas como hipersensibles a la actividad de nucleasas, representan la pérdida de la estructura condensada de la cromatina, encontrándose más expuestas a la actividad de nucleasas y a la transcripción (Thurman *et al.*, 2012). El número al lado de cada rectángulo gris corresponde a la cantidad de líneas celulares en las cuales se ha comprobado la hipersensibilidad de esa región génica en particular, evidenciando que el sitio cercano a la ubicación del HRE proximal de ALS2 evidencia una potencial región susceptible a la inducción de la transcripción entre la región promotora de ALS2.





**Figura 15. Análisis bioinformático de H3K27Ac y zonas hipersensibles a DNAsa I en la región promotora de ALS2 (adaptado de la base de datos UCSC Genome Browser output (hg18)).** En **A**, se muestra una representación de la secuencia génica de ALS2 ubicada entre el +100 y -782 pb. En **B**, se muestra la escala utilizada y la región cromosómica de interés en el cromosoma 2 (Chr 2). En **C**, se presenta el primer exón o sitio de inicio de la transcripción de ALS2, el cual es representado por un rectángulo azul. El +1 indica el primer nucleótido del primer exón. Hacia la derecha del +1. En **E**, se muestra la posición aproximada del HRE putativo en estudio (-782 y -788 pb). En **D**, se muestran los niveles de enriquecimiento de la marca de histonas H3K27Ac en la secuencia de ALS2 (definido por ensayos de Chip-Seq a lo largo de todo el genoma). De forma determinada, esta base de datos utiliza un método de superposición para mostrar datos presentes en varias líneas celulares (representadas en montes y valles de colores) al mismo tiempo, por lo que cada línea celular está asociada a un color particular <http://bernstein.mgh.harvard.edu/> (ver abajo). En **F**, el rectángulo negro y gris indican la extensión e intensidad de la región hipersensible a DNAsa I, lo cual deriva de ensayos positivos en 95 (rectángulo negro) y 52 (rectángulo gris) tipos celulares gracias a <http://www.gs.washington.edu/faculty/stamj.htm> (Thurman *et al.*, 2012).

■ GM12878   
 ■ H1-hESC   
 ■ HSMM   
 ■ HUVEC   
 ■ K562   
 ■ NHEK   
 ■ NHLF

## 2.6 El HRE putativo de ALS2, posee secuencias aledañas similares a genes blancos de HIF-1 $\alpha$

La identificación *in-silico* de los sitios de unión a factores de transcripción, como la identificación de HREs es una herramienta complementaria muy poderosa para identificar blancos de HIF-1 $\alpha$  (Elnitski *et al.*, 2006). La conservación de otras secuencias fuera de este motivo es controversial, ya que algunos estudios sugieren que existen secuencias auxiliares aledañas pero con una distribución aleatoria en los genes blancos de HIF-1 (Thurman *et al.*, 2012); mientras que otros estudios, demuestran la necesidad de estas secuencias consenso auxiliares de aproximadamente 4 a 5 nucleótidos cercanas al motivo 5'-(A/G)CGTG-3' de HIF-1 $\alpha$  (Elnitski *et al.*, 2006, Kimura *et al.*, 2001, Pescador *et al.*, 2005). Para indagar más sobre el potencial transcripcional de la región cercana al HRE de ALS2 en estudio, se evaluó la posible existencia de secuencias auxiliares cercanas al HRE putativo de ALS2. Para llevarlo a cabo, se seleccionaron y analizaron blancos de HIF-1 $\alpha$  que posean secuencias aledañas funcionales específicamente cercanas a la secuencia consenso de unión a HIF-1 $\alpha$ , y luego se realizó un análisis comparativo con las secuencias aledañas al HRE putativo de ALS2. Como se observa en la [tabla 1](#), ALS2 posee las secuencias 5'-TCGC-3' y 5'-GAAG-3' que delimitan el HRE putativo 5'-ACGTG-3'. Sorprendentemente, estas secuencias están presentes en algunos genes blancos de HIF-1 $\alpha$  como en la prolil hidroxilasa 4, CXCR4 y la fosfoglicerato kinasa. Además, al analizar genes con características oncogénicas, encontramos que el gen de la telomerasa, c-met, PGK1 y RhoA poseen la secuencia 5'-GAAG-3'. Esto nos lleva a suponer que, posiblemente, estas secuencias consenso podrían ser elementos auxiliares putativos para potenciar la transcripción de ALS2.

Secuencia consenso	Ubicación	Nombre del gen	Referencia
TCGCACGTGGAAGTCCC	-796/-779	ALS2	Esta tesis
TCGCTACGTGCGCTCAGT	-75/-92	P4HA1	(Takahashi <i>et al.</i> , 2000)
GAGGC GCGTG CGTCGCG	-1292/-1309	CXCR4	(Staller <i>et al.</i> , 2003)
TCGCGTCGTGCAGGACGT	-226/-209	PGK1	(Okino <i>et al.</i> , 1998)
TGCGCACGTGGGAAGCCC	+40/+57	TERT	(Nishi <i>et al.</i> , 2004, Yatabe <i>et al.</i> , 2004)
AGCGC GCGTGTGGGAAGG	+142/+159	c-met	(Pennacchietti <i>et al.</i> , 2003)
GACGTGACAAACGAAGCC	-199/-180	PGK1	(Rodriguez <i>et al.</i> , 1997)
CTACGTGCAGACTTGAAGC	-1.100/-1080	RhoA	(Gilkes <i>et al.</i> , 2014)

**Tabla 1. Análisis *in-silico* de secuencias aledañas al sitio de unión de HIF-1 presentes en sus genes blancos y en ALS2.** Utilizando la base de datos *ensembl.org*, se accedió a la secuencia nucleotídica de ALS2 y se identificó el HRE proximal (HRE -782 a -788 pb, violeta), posteriormente se realizó un análisis bibliográfico de las secuencias consenso de unión a HIF-1 en genes blancos y se realizó una comparación de sus secuencias aledañas (o accesorias), encontrando que las secuencias 5'-TCGC-3' y 5'-GAAG-3' están presentes no solo en ALS2, sino que también en genes blancos de HIF-1.

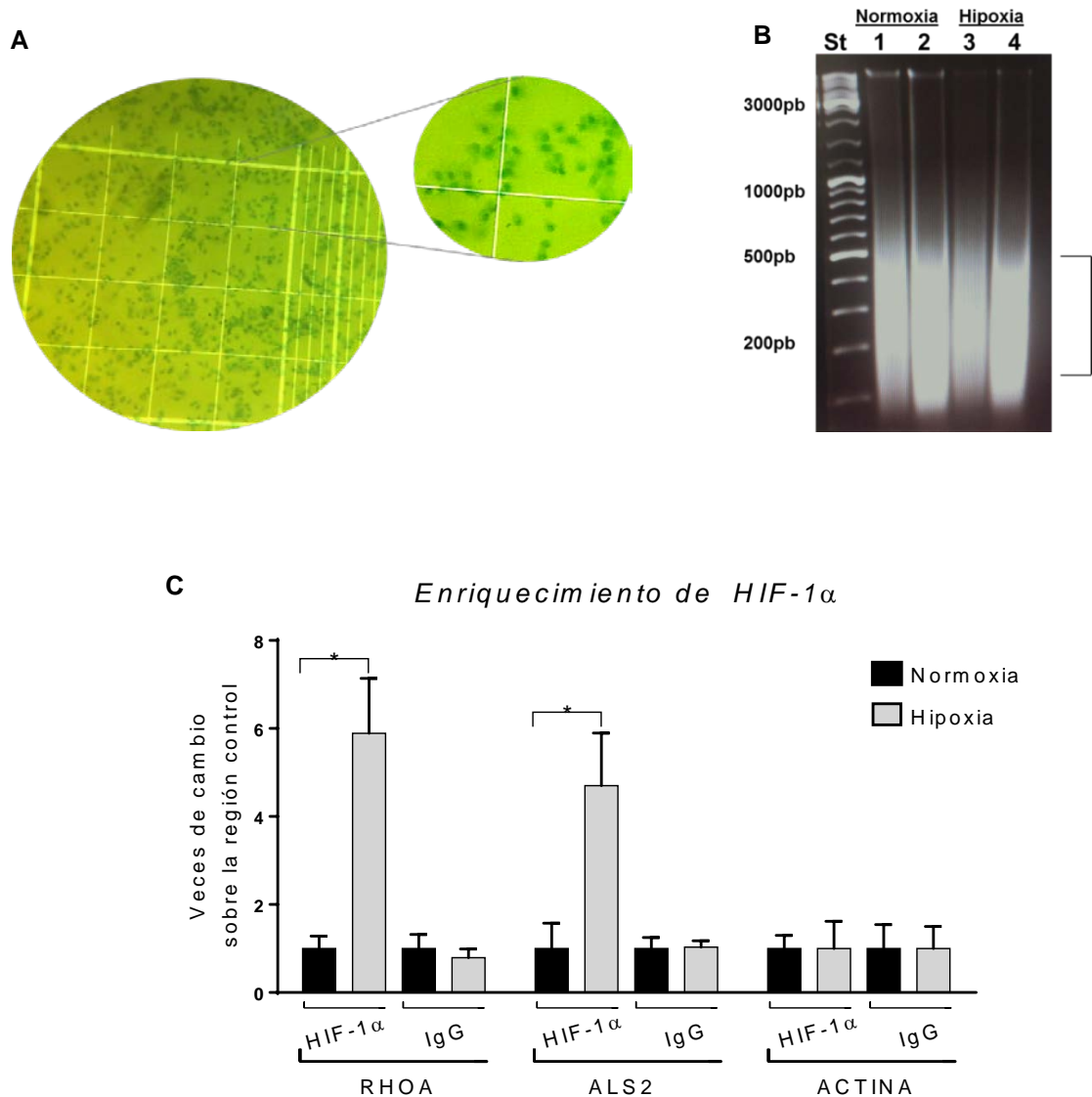
## 2.7 HIF-1 $\alpha$ se une al HRE proximal de ALS2 en hipoxia

Posterior al análisis bioinformático, quisimos conocer si HIF-1 $\alpha$  estaría interactuando físicamente con el HRE proximal de ALS2 en las células A549 bajo condiciones de hipoxia. Para dilucidar esta interrogante, utilizamos la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para determinar si existe la unión de HIF-1 $\alpha$  a la secuencia promotora de ALS2.

Posterior a la fijación con paraformaldehído al 4%, las células A549 fueron procesadas mediante disgregación mecánica con 60 golpes con pistilo de vidrio para romper membranas y liberar los núcleos, lo cual fue comprobado con tinción de azul tripán (Figura 16A). Una vez realizada la disgregación celular, se realizó la sonicación de cromatina en fragmentos entre 200 y 500 pb (Figura 16B), de esta manera, mediante el uso de un anticuerpo policlonal grado ChIP contra HIF-1 $\alpha$  (ABCAM, grado ChIP) se capturaron y enriquecieron los fragmentos de DNA unido a HIF-1 $\alpha$ . Luego, se revirtió el entrecruzamiento generado por la fijación y se purificó el complejo HIF-1 $\alpha$ : DNA, para finalmente realizar la técnica de qPCR y cuantificar la amplificación de segmentos enriquecidos con HIF-1 $\alpha$ . Para esto, como se diseñaron partidores específicos para amplificar el sitio de unión de HIF-1 $\alpha$  a RhoA como control positivo (-1.1 kb al sitio de inicio de transcripción descritos previamente (Gilkes *et al.*, 2014), y también para la región que contenía el HRE putativo de ALS2 (-792 a -788 pb), además de un fragmento del promotor de actina, el cual fue empleado como control negativo de la transcripción de HIF-1 (ver anexos, tabla S3). Los 3 experimentos independientes fueron evaluados en condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h.

Los resultados evidenciaron un aumento significativo del enriquecimiento de HIF-1 $\alpha$  en el promotor de RhoA en condiciones de hipoxia, en comparación a lo observado en normoxia, lo cual fue condordante con lo descrito previamente (Gilkes *et al.*, 2014). De forma importante y acorde con lo propuesto, se observó también un enriquecimiento significativo de HIF-1 $\alpha$  en el HRE ubicado en la posición -792 a -788 pb, de ALS2 en hipoxia, en comparación a la condición normoxia (figura 16C).

De esta manera, se sugiere que el HRE proximal de ALS2 (-792/-788 pb) es un sitio sensible a la actividad transcripcional (figura 15), y que es un sitio de unión directa al factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , lo que explicaría el aumento de la expresión de ALS2, como se documentó previamente en las figuras 11F, 12D, 13C y 13E.



**Figura 16. Identificación del sitio de unión de HIF-1 $\alpha$  en el promotor de la GEF de Rab5 ALS2.** Previamente, las células se crecieron e incubaron en normoxia e hipoxia por 24 h previo a la lisis celular. **(A)** Imagen representativa de la disgregación mecánica con 60 golpes con pistilo, posteriormente, las células fueron teñidas mediante la tinción con tripan azul. **(B)** Gel de agarosa. En 1, se cargaron 5  $\mu$ L y en 2, se cargaron 10  $\mu$ L de las muestras previamente sonicadas, el corchete de la derecha indica el tamaño estándar (200 a 500 pb) de los fragmentos de la cromatina. **(C)** Gráfica representativa del promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  el error estándar para las veces de cambio de RhoA (control positivo) y para ALS2 en normoxia e hipoxia. Los datos fueron normalizados sobre los niveles del control negativo (actina). Los análisis estadísticos se realizaron con el test one-way ANOVA. (\*  $p < 0,05$ ).

## *RESUMEN OBJETIVO 2.*

*Luego de evidenciar que el aumento de los niveles de Rab5-GTP por hipoxia son dependientes de HIF-1 $\alpha$  (Silva et al., 2016), y documentar que este aumento no es producto de un incremento de los niveles de Rab5 total, una interesante opción sería que HIF-1 $\alpha$  estuviera induciendo la transcripción y posterior expresión de alguna GEF de Rab5. Para esto, se realizó una búsqueda bibliográfica para seleccionar solo aquellas GEFs de Rab5 que tuvieran implicancias en tumorigénesis, además, se realizó un análisis de sus secuencias génicas donde se evidenció que RIN1, RIN2, RIN3, Rabex-5 y ALS2, poseen HREs putativos dentro de sus respectivos genes. Luego se observó que 24 h de hipoxia inducen un aumento significativo de los niveles de mRNA de RIN2, RIN3 y ALS2, situación que fue apoyada en el modelo celular RCC y RCC<sup>+vhl</sup>, observándose que la estabilización endógena de HIF-1 $\alpha$  en normoxia es suficiente para aumentar solo los niveles de ALS2, sin cambiar de forma significativa la expresión de otras GEFs. Finalmente y mediante la técnica de ChIP se demostró que HIF-1 $\alpha$  se une directamente al HRE proximal (-792 a -788 pb) del promotor de ALS2 y de forma significativa.*

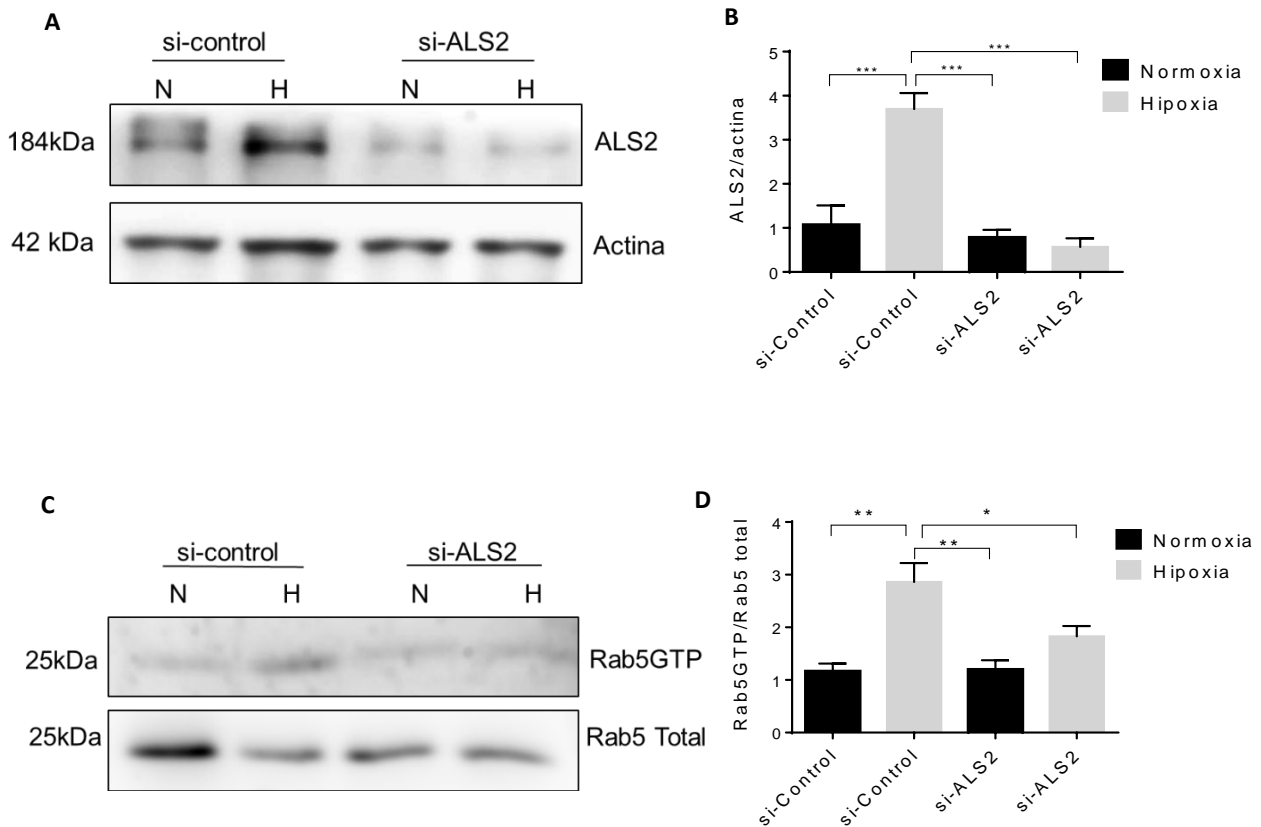
*De esta manera, en el objetivo N°2 concluimos que HIF-1 $\alpha$  regula la expresión de la GEF de Rab5 ALS2 a nivel transcripcional, tanto en la línea celular A549 como RCC.*

### **3. Determinar si las GEFs inducidas por HIF-1 $\alpha$ participan en la activación de Rab5, promueven la migración y la invasión de células tumorales en hipoxia.**

Tanto la hipoxia como HIF-1 $\alpha$  inducen a la activación de diversas vías de señalización como aquellas implicadas en la invasión tumoral y metástasis (Eisinger-Mathason *et al.*, 2013, Semenza, 1998, Vaupel & Mayer, 2007). Por otro lado y siguiendo con la misma línea, estudios de nuestro laboratorio (Diaz *et al.*, 2014, Mendoza *et al.*, 2013, Mendoza *et al.*, 2018) y otros grupos (Frittoli *et al.*, 2014, Palamidessi *et al.*, 2013), han demostrado que la activación de Rab5 induce un rápido recambio de adhesiones focales mediante el tráfico endocítico y la inducción de proteasas específicas para su desensamblaje, desencadenando un aumento de la migración e invasión tumoral (Frittoli *et al.*, 2014, Palamidessi *et al.*, 2013). Además, utilizando modelos animales, en nuestro laboratorio se documentó previamente la relevancia de Rab5 para potenciar la metástasis en condiciones de hipoxia (Silva *et al.*, 2016). Dado que en este trabajo de tesis se ha demostrado que HIF-1 $\alpha$  induce la expresión de ALS2 y también la activación de Rab5, una posibilidad es que HIF-1 $\alpha$  promueva la migración e invasión de células tumorales en hipoxia vía inducción de la expresión de ALS2, y posterior activación de Rab5.

#### **3.1 ALS2 es necesario para el aumento de Rab5-GTP en hipoxia**

En esta tesis se ha demostrado que este aumento de Rab5-GTP ocurre en paralelo con el aumento de la expresión de la GEF ALS2, la cual a su vez es controlada por HIF-1 $\alpha$  tanto en condiciones de hipoxia como en normoxia (Objetivo Específico 2). Con estos antecedentes, la siguiente pregunta fue si la GEF ALS2 estaría implicada en el aumento de los niveles de Rab5-GTP inducidos por hipoxia. Para esto, se usó una mezcla de RNAs interferentes contra ALS2 (3 secuencias con distintos blancos, sc-60154; siRNA-control, sc-37007), la cual fue previamente estandarizada a una concentración de transfección de 100 nM (ver anexo, figura S8). Posterior a la transfección, las células se incubaron en normoxia e hipoxia por 24 h como se observa en la figura 17A y B, y se realizó la técnica de pull-down para cuantificar los niveles de Rab5-GTP. Como se observa en la figura 17C, la condición siRNA-control mostró niveles de Rab5-GTP estadísticamente mayores en hipoxia, en comparación a las células incubadas en normoxia, mientras que para la condición siRNA-ALS2, la hipoxia no produjo un aumento significativo en los niveles de Rab5-GTP en comparación a los niveles documentados en normoxia (figura 17D). De esta manera, se demostró que el aumento de los niveles de Rab5-GTP por hipoxia son dependientes de la expresión de la GEF de Rab5 ALS2.



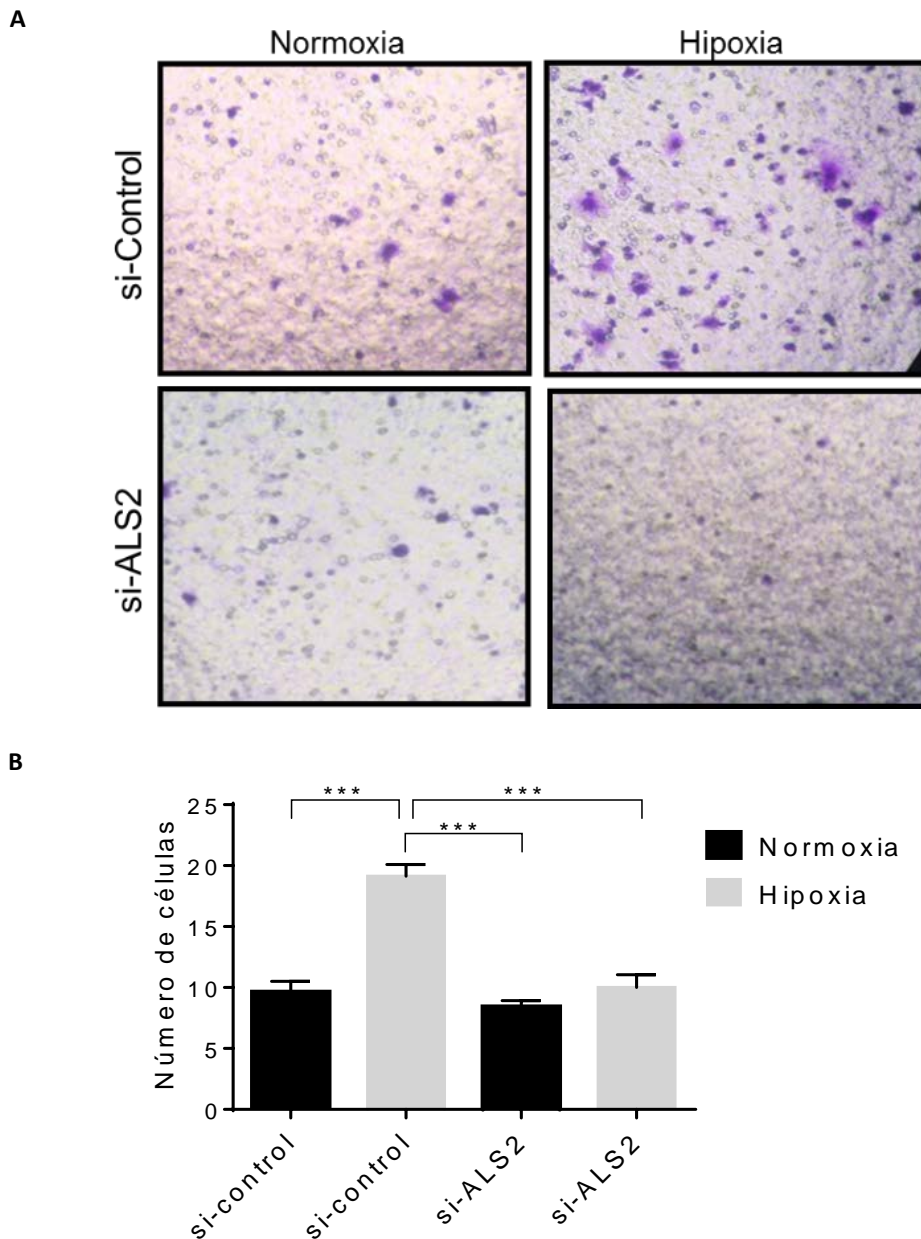
**Figura 17. Cuantificación de Rab5-GTP en células A549 expuestas a niveles disminuidos de ALS2 en normoxia e hipoxia por 24 h.** Previamente, se sembraron 600.000 células para luego transfectarlas por 16 h con 100 nM de siRNAs control y siRNAs ALS2. Posteriormente las células se incubaron en normoxia e hipoxia por 24 h y se procedió a realizar la lisis celular. **(A)** Western blot representativo del control de transfección, utilizando los anticuerpos contra ALS2 y actina (control de carga). **(B)** Cuantificación de los niveles de ALS2 y actina. **(C)** Cuantificación de los niveles de Rab5-GTP y Rab5 total mediante la técnica de pull-down. **(D)** Gráfica representativa del promedio de 3 ensayos de pull-down independientes  $\pm$  el error estándar. Los análisis estadísticos se realizaron con el test one-way ANOVA. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### ***3.2 La expresión de la GEF ALS2 induce la migración de células tumorales bajo el estímulo de hipoxia***

La hipoxia y su relación con la adquisición de características oncogénicas, tiene sus orígenes en el año 1909, cuando Schwarz y colaboradores notaron que las células normales en hipoxia fueron menos sensibles a la radiación en comparación a aquellas células irradiadas en presencia de oxígeno; siendo esta observación un cimiento fundamental en el estudio de las terapias contra el cáncer (O'Toole *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2008). Además de la resistencia a la radiación, existen otras características malignas que son fuertemente estimuladas por hipoxia, dentro de las cuales destaca la migración celular, el cual es un fenómeno imprescindible para el consecuente desarrollo de la invasión y metástasis tumoral (Chan & Giaccia, 2007, Eisinger-Mathason *et al.*, 2013, Escobar, 1964, Sieck, 2013, Silva *et al.*, 2016, Wang & Semenza, 1995).

Por este motivo, y por los hallazgos presentados previamente (figura 6A), donde la hipoxia es capaz de inducir la migración de células tumorales, nos preguntamos si la GEF-ALS2 sería necesaria para que la migración ocurra en condiciones de hipoxia. Para ello, las células A549 fueron transfectadas con RNAs interferentes control y contra ALS2 (según lo descrito en el punto 3.1) por 16 h y posteriormente las células transfectadas fueron incubadas en normoxia e hipoxia por 24 h (figura 17A). Inmediatamente, se sembraron 25 mil células en transwells tratados previamente con fibronectina 2 µg/mL (ver detalles en materiales y métodos). Las células sembradas se incubaron por 1 h y finalmente fueron teñidas con cristal violeta para observar y cuantificar el número de células migratorias. Como se observa en la figura 18A y B, las células control presentaron un aumento significativo de la migración celular bajo el estímulo de hipoxia, en comparación a aquellas incubadas en normoxia. De forma importante, se observó que esta inducción de la migración, cae de forma significativa cuando se interfiere con la expresión de ALS2 en hipoxia, alcanzando incluso niveles similares a los presentados por las células incubadas en normoxia (figura 18B).





**Figura 18. Cuantificación de la capacidad migratoria de células A549 expuestas a niveles disminuidos de ALS2 en condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h.** Previamente, se sembraron 600.000 células para luego transfectarlas por 16 h con 100 nM de siRNAs control y siRNAs ALS2. Posteriormente, las células se incubaron en normoxia e hipoxia por 24 h e inmediatamente se sembraron 25.000 células y se inició la migración por 1 h en transwells cubiertos con 2  $\mu$ g/mL de fibronectina. Finalmente, las células que migraron se tiñeron con cristal violeta. **(A)** Microfotografías representativas obtenidas con un aumento de 10x luego de 1 h de migración. **(B)** Los gráficos muestran el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  el error estándar. Los análisis estadísticos se realizaron con el test one-way ANOVA (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### **3.3 La invasión celular inducida por hipoxia es dependiente de la expresión de la GEF ALS2**

Cuando las células tumorales de origen epitelial comienzan a migrar, la primera barrera que encuentran es la membrana basal. Para atravesar la membrana basal, las células tumorales deben digerirla mediante la expresión, secreción y activación de distintas metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Gao *et al.*, 2005). Cuando el tumor ha invadido el estroma del tejido, las células tumorales invasivas poseen una mayor capacidad metastásica, ya que la probabilidad de encontrar e ingresar en vasos linfáticos o sanguíneos está favorecida (Alizadeh *et al.*, 2014).

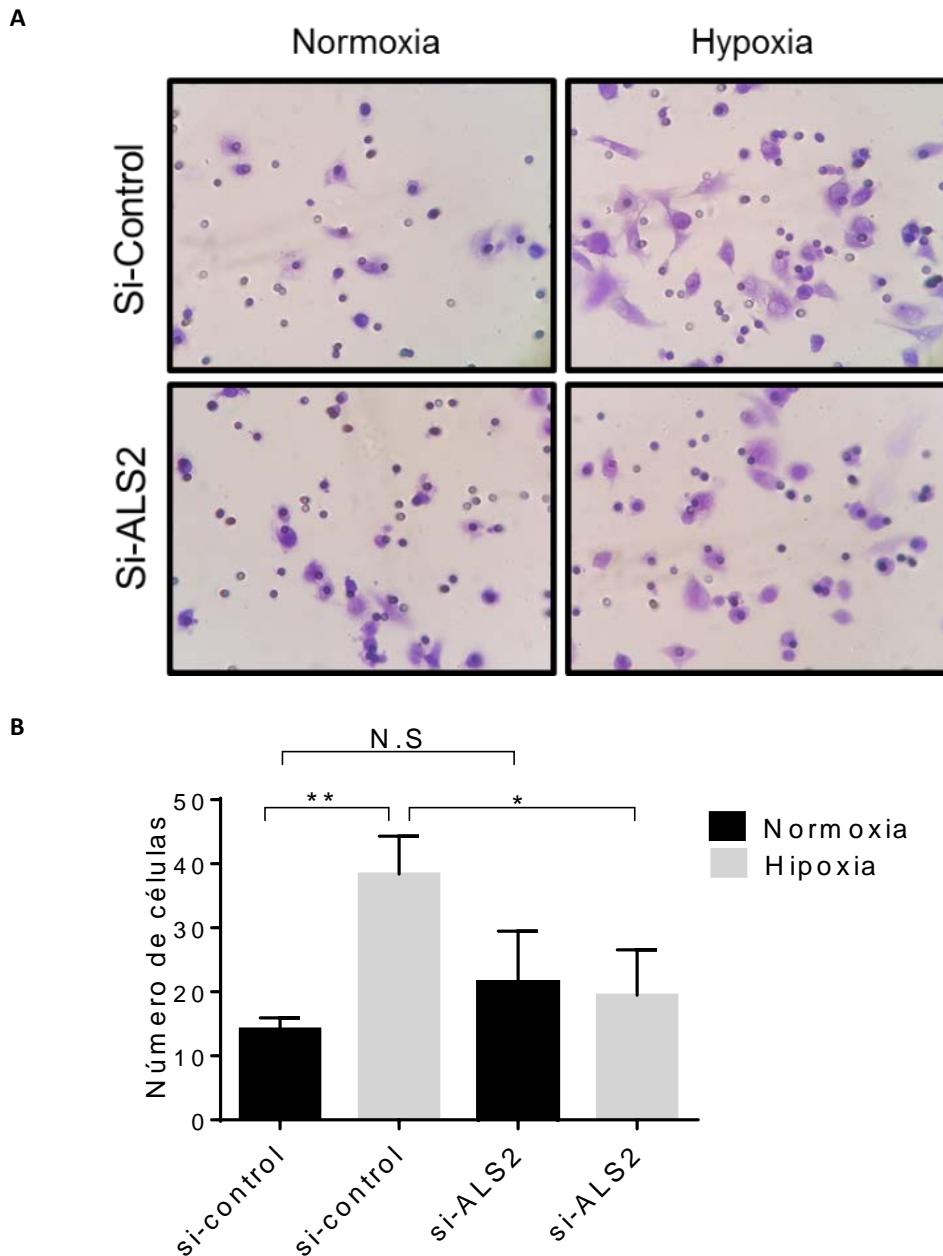
Cuando se observó que la migración celular por hipoxia era regulada por la expresión de ALS2, decidimos evaluar la capacidad invasiva de las células tumorales en hipoxia, alterando la expresión de ALS2 con moléculas de RNA interferentes (figura 17A).

Como se observa en la figura 19A y B, las células siRNA-control en hipoxia incrementan la invasión celular, observando casi el doble de número de células que invadieron el matrigel en comparación a lo observado en las células incubadas en normoxia. Sin embargo, al reducir los niveles de ALS2 en hipoxia (siRNA-ALS2), el número de células invasivas disminuyó de forma significativa, demostrando que ALS2 es importante para estimular la invasión celular en condiciones de hipoxia.

#### **RESUMEN OBJETIVO 3**

*Luego de evidenciar que HIF-1 regula la expresión de ALS2 en hipoxia, nos preguntamos si ALS2 sería en parte responsable del aumento de los niveles de Rab5-GTP por hipoxia. Para aclarar esta interrogante, fue necesario silenciar la expresión de ALS2 y evaluar los niveles de Rab5-GTP en condiciones de hipoxia celular, evidenciando que la activación de Rab5 cae de forma significativa en comparación a la condición que posee niveles estables de ALS2 en hipoxia. Como nuestros hallazgos se fundamentan en un modelo de células tumorales y, que la activación de Rab5 se relaciona de forma directa con la inducción de la migración e invasión celular en hipoxia, decidimos evaluar ambos fenómenos posterior a la intervención de la expresión de ALS2, encontrando que tanto la migración como la invasión celular inducida por la hipoxia, son reguladas por la expresión de ALS2. Estos hallazgos nos llevan a proponer a la GEF de Rab5 ALS2 como un posible punto de control de la migración e invasión tumoral inducida por la hipoxia.*

*De esta manera, en el objetivo N°3 concluimos que la GEF ALS2 es importante para promover el aumento de los niveles de Rab5-GTP, la migración e invasión celular en condiciones de hipoxia. Estos hallazgos abren una nueva puerta al estudio de ALS2, la cual nunca antes había sido implicada en el desarrollo y promoción del cáncer.*



**Figura 19. Estudio de la capacidad invasiva de células A549 expuestas a niveles disminuidos de ALS2 en condiciones de normoxia e hipoxia por 24 h.** Previamente, se sembraron 600.000 células para luego transfectarlas por 16 h con 100 nM de siRNAs control y siRNAs ALS2. Posteriormente las células se incubaron en normoxia e hipoxia por 24 h e inmediatamente, se sembraron 100.000 células por cada condición dentro de insertos matrigel. Luego de 24 h de invasión, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con azul de toluidina al 1%. **(A)** Las microfotografías se obtuvieron con un aumento de 10x y se tomaron 5 microfotografías por condición experimental. Las células que migraron se cuantificaron en un microscopio invertido, tomando 5 microfotografías por campo 10x **(B)** Se calculó el promedio de 3 experimentos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron con el test one-way ANOVA (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

## IX. DISCUSIÓN

A pesar de que la exposición prolongada a la hipoxia resulta ser tóxica a nivel celular, cuando se presenta a nivel del microambiente tumoral, genera una presión selectiva sobre aquellas células que tienen un mayor potencial maligno. De esta manera, la hipoxia tumoral promueve la supervivencia de las células cancerosas, mediante la activación de respuestas celulares adaptativas como la proliferación, migración e invasión tumoral, los cuales son eventos celulares que favorecen la progresión tumoral y metástasis. Además, de forma independiente a estos hallazgos, se ha descrito que la hipoxia tumoral ha sido asociada a un mal pronóstico clínico de los pacientes con cáncer (Muz *et al.*, 2015, Vaupel & Mayer, 2007, Walsh *et al.*, 2014).

El mecanismo clásico por el cual la hipoxia induce respuestas celulares adaptativas como la migración e invasión celular, es a través de la inducción transcripcional de genes específicos (Semenza, 2003). Estos eventos transcripcionales ocurren posterior a la estabilización del factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1. Recientemente, se demostró que la expresión de RhoA, la cual es una GTPasa importante en la formación de fibras de estrés y migración celular, es inducida por la hipoxia a través de la unión de HIF-1 $\alpha$  a un elemento de respuesta a la hipoxia (HRE 5'-(A/C)CGTG-3), ubicado en la región promotora del gen de RhoA (Gilkes *et al.*, 2014).

En esta tesis, estudiamos los efectos de la hipoxia sobre la activación de Rab5, evento que resultó ser dependiente de la actividad de HIF-1 $\alpha$ . Para explicar este fenómeno, una primera posibilidad fue que la hipoxia, mediante la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , podría estar promoviendo la transcripción y posterior expresión de Rab5 y, de esta manera, como consecuencia del aumento de la proteína total, llevaría por lo tanto a un aumento en su activación.

Para investigar acerca de esta idea, se evaluaron los niveles de Rab5 total en distintos períodos de incubación en hipoxia, sin observar cambios significativos entre las condiciones de normoxia e hipoxia estudiadas. Incluso, al interferir con la expresión y también con la actividad de HIF-1 $\alpha$ , Rab5 total no presentó cambios significativos al comparar sus niveles tanto en hipoxia como en normoxia. Estas observaciones fueron intrigantes, ya que HIF-1 $\alpha$ , el cual es un factor de transcripción maestro en respuestas adaptativas, en condiciones de hipoxia sólo estaría aumentando los niveles de Rab5-GTP, sin interferir con la expresión ni la síntesis de novo de la proteína.

Rab5 es una GTPasa, cuyo rol canónico consiste en orquestar el tráfico endocítico (Christoforidis *et al.*, 1999, Nielsen *et al.*, 1999). No obstante, diversos estudios han indicado que además de su función

canónica, Rab5 promueve la migración e invasión de células tumorales, donde el tráfico endocítico es muy importante.

Entre los eventos regulados por Rab5, destacan la formación de *lamellipodios* (Pellinen & Ivaska, 2006), el aumento del reciclaje de integrinas  $\beta 1$  (Torres *et al.*, 2010), el recambio de las adhesiones focales (Mendoza *et al.*, 2013, Palamidessi *et al.*, 2013) y, además, como antecedente importante para este trabajo, se documentó que Rab5 es necesario para promover la metástasis pulmonar de células tumorales de melanoma en condiciones de hipoxia (Silva *et al.*, 2016).

Para que Rab5 cumpla todo este abanico de funciones, necesita estar activo, es decir unido a una molécula de GTP, lo cual es llevado a cabo por factores intercambiadores de los nucleótidos de guanina (GEFs) específicos de Rab5.

Diversas GEFs de Rab5, han sido implicadas en eventos tumorales y de transformación maligna. Entre las cuales destacan RIN1 y Rabex-5, las cuales han sido asociadas a la inmortalización celular, y por otro lado, están aumentadas en muestras tumorales de pacientes con melanoma y cáncer gástrico (Fang *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014). Además, se ha documentado que RIN2 es importante en la vía de señalización de RAS, inhibiendo así los complejos de unión intercelular y promoviendo un fenotipo tumoral tipo mesenquimal con capacidad invasiva (Kimura *et al.*, 2006).

## 1. Algunas GEFs de Rab5 son inducidas por la hipoxia

Los resultados expuestos hasta el momento, indican que la hipoxia y HIF-1 $\alpha$  no aumentan los niveles de Rab5 total y por lo tanto, una posibilidad es que este aumento esté siendo regulado por moléculas GEFs. De esta manera, en esta tesis, se documentó que **la hipoxia aumenta los niveles de mRNA de las GEFs ALS2, RIN2 y RIN3** en las células A549, mientras que en un modelo complementario de estabilización endógena a HIF-1 $\alpha$  (células RCC), tanto RIN2 como RIN3, no presentaron cambios significativos, a pesar que ambas GEFs poseen HREs putativos.

Por otro lado, respecto a la expresión de mRNA de RIN2 y RIN3 en células RCC, es posible que sea regulada por otros eventos orquestados también por la hipoxia, y no necesariamente por la vía canónica de HIF-1 $\alpha$ .

Una posible explicación, es que la hipoxia aumente la vida media de los mRNAs de RIN2 y RIN3, o que la hipoxia, induzca la expresión de otros factores de transcripción, como HIF-2 o aquellos relacionados con la transición epitelio-mesénquima, como es el caso del factor de transcripción Twist (Yang *et al.*, 2008).

Este último es intrigante, pues Twist inhibe la expresión de una proteína importante para las adhesiones intercelulares, conocida como e-cadherina (Yang *et al.*, 2008). La pérdida de la expresión de esta proteína se asocia con la transición epitelio - mesénquima, lo cual ocurre frecuentemente en la metástasis tumoral (Heerboth *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que la GEF de Rab5 RIN2 es capaz de interferir con la expresión y localización de e-cadherina mediante el aumento de su endocitosis (Kimura *et al.*, 2006). En base a estos antecedentes, es posible proponer que la expresión de Twist, podría estar mediando también el aumento de los niveles de mRNA de estas GEFs. Otra posible explicación a este aumento en los niveles de mRNA de RIN2 y RIN3, es que la hipoxia mediante el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), la cual es capaz de activar diversas vías de señalización (Chi *et al.*, 2010), esté influyendo también sobre la expresión o estabilidad de las GEFs RIN2 y RIN3.

De forma interesante, se han demostrado mecanismos por los cuales la hipoxia podría promover la migración e invasión en las células tumorales de forma independiente a HIF-1 $\alpha$ . Estos hallazgos se demostraron en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama, donde la hipoxia es capaz de promover la estabilización y alineamiento de los microtúbulos, lo cual contribuye a la polarización celular y direccionalidad del movimiento, aumentando así la migración celular (Yoon *et al.*, 2005). Este fenómeno es concordante con el hecho de que los microtúbulos actúan como pistas (*tracks*) para el transporte de vesículas hacia el extremo líder de la célula (*leading edge*), potenciando así el reciclaje de integrinas ( $\alpha 6\beta 4$  principalmente) vía Rab11. Uno de los resultados sorprendentes de este estudio, es que este evento depende de la expresión de Rab11, siendo necesario para que la invasión celular ocurra (Yoon *et al.*, 2005). Pero al analizar la expresión de Rab11 por hipoxia, se observó que no dependía de HIF-1 $\alpha$ , sino de la acumulación de tubulina detirosinada (tubulina Glu). Esta tubulina estabilizada, se acumula en los microtúbulos de las células migratorias, con el consecuente aumento del reciclaje mediado por Rab11 (Yoon *et al.*, 2005).

De esta manera, gracias a las observaciones de este y otros trabajos, es posible pensar que la hipoxia, de forma independiente a HIF-1 $\alpha$ , esté induciendo el aumento del mRNA de las GEFs RIN2 y RIN3, las cuales posiblemente aportarían a la progresión tumoral (Saito *et al.*, 2002). **Por este motivo resulta importante continuar dilucidando el aporte de RIN2 y RIN3 en los eventos relacionados a la progresión tumoral en condiciones de hipoxia.**

## **2. Un nuevo mecanismo transcripcional para la activación de GTPasas en hipoxia**

En esta tesis se indagó acerca del mecanismo por el cual HIF-1 $\alpha$  activa a Rab5. Un antecedente importante encontrado en esta tesis, es que la hipoxia aumenta los niveles de mRNA de las GEFs RIN2, RIN3 y ALS2. A diferencia de RIN2 y RIN3, la expresión de los transcritos y niveles proteicos de la GEF ALS2 son regulados de manera dependiente de la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , lo cual fue incluso observado en ausencia de hipoxia celular.

Una posible explicación, fue que este evento ocurra a través de la unión física de HIF-1 $\alpha$  al promotor proximal del gen que codifica para ALS2. De esta manera, mediante el estudio de los HREs putativos presentes en ALS2, se encontró que específicamente en el HRE ubicado en los nucleótidos -788 y -792, respecto al inicio de la transcripción, es reconocido y se encuentra significativamente enriquecido por HIF-1 $\alpha$  en condiciones de hipoxia.

Consecuentemente además, se demostró que en hipoxia, ALS2 es necesario para aumentar la actividad de Rab5, así como también la migración e invasión de las células tumorales A549.

Respecto al control transcripcional de HIF-1 $\alpha$  sobre GTPasas Rabs, es muy poco lo que se conoce y, hasta el momento, se ha descrito que HIF-1 $\alpha$  regula sólo la expresión de 2 GTPasas de la familia Rabs, una de ellas es la Rab20, la cual es clave para inducir apoptosis cuando la hipoxia es prolongada (Devon et al., 2003) y por otro lado, se demostró que la hipoxia induce la formación de cuerpos multivesiculares y microvesículas, que estimulan la invasión y metástasis de forma paracrina mediante la inducción transcripcional de la Rab22A (Hadano *et al.*, 2001). Sin embargo, en estos estudios se evaluaron solamente los niveles de proteínas totales, sin considerar la activación de estas GTPasas, ni su disociación de GDP. Teniendo en cuenta que no existen estudios en la literatura que relacionen un mecanismo por el cual la hipoxia pudiese controlar la actividad de GTPasas pequeñas, es que podemos afirmar que nuestro trabajo es el primero en documentar que HIF-1 $\alpha$  regula la actividad de una GTPasa (Rab5-GTP) a través de la inducción transcripcional de la GEF ALS2.

## **3. ALS2: una nueva conexión entre tráfico endocítico, migración e invasión tumoral**

ALS2 es una proteína de 184 kDa que posee 3 dominios GEFs putativos para distintas GTPasas, conocidos desde el extremo amino terminal como RDL (del inglés *regulator of chromosome condensation like domain*, correspondiente a un dominio putativo para la GTPasa Ran), DH/PH (del inglés *Diffuse B linfoma homology/pleckstrin homology*, ambos correspondientes a dominios putativos de las GTPasas RhoA/Rac respectivamente) y finalmente, la región carboxilo terminal

contiene el dominio VPS9 (del inglés *Vacuolar protein sorting*) el cual correspondiente al dominio GEF de la GTPasa Rab5, siendo solamente el dominio VPS9 un dominio GEF funcional en ALS2 (Otomo *et al.*, 2003).

Aunque varios autores han documentado la importancia de ALS2 en las etapas tempranas y tardías de la regulación del tráfico endocítico, la mayoría de estos estudios han sido realizados en cultivos primarios de neuronas provenientes de animales *knockout* para ALS2 (Cai *et al.*, 2008). Solamente uno de ellos, realizó un cultivo primario de fibroblastos provenientes de ratones ALS2<sup>-/-</sup>, donde se observó un retardo del tráfico endocítico del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Hadano *et al.*, 2010).

Por otra parte, estudios en cultivos primarios de neuronas hipocampales provenientes de ratones ALS2<sup>-/-</sup>, indicaron que los endosomas positivos para Rab5, presentaron formas alargadas y una motilidad endosomal casi nula, en comparación a la forma y a la motilidad que presentaron aquellos endosomas provenientes de ratones ALS2<sup>+/+</sup>, evidenciando la importancia de ALS2 en la fisión y tráfico de estos endosomas a través de la red de microtúbulos (Storti *et al.*, 2014).

Hadano y col., el año 2010, utilizando microscopía electrónica, evidenciaron que las neuronas de la médula espinal de ratones con pérdida de función de ALS2, presentaron axones degenerados e hinchados por la acumulación de agregados granulares presentes en vesículas, lo cual, sumado al ralentización de su distribución, evidencian un trastorno del tráfico endocítico provocado por la ausencia de ALS2 en neuronas (Hadano *et al.*, 2010), **demostrando de esta forma también, la importancia de la expresión de ALS2 en la regulación fisiológica del tráfico endocítico**, el cual ha sido considerado un evento importante en los fenómenos de migración e invasión tumoral.

A pesar de que el modelo neuronal no es comparable con las líneas celulares tumorales, estos resultados podrían ser considerados como evidencia, ya que en general, la ruta celular endocítica es bien conservada entre los distintos tipos celulares (Stenmark, 2009).

En la actualidad, existen solo 2 estudios de ALS2 en células tumorales; uno de ellos explicó la importancia del dominio VPS9 en la localización intracelular de ALS2 en células de carcinoma cérvico-uterino HeLa, demostrando que ALS2 co-localiza en endosomas tempranos con Rab5 y EEA1 y también, se encontró que gran parte de la distribución de ALS2 ocurre en el frente de avance de las mismas células tumorales. Estas marcas observadas por inmunofluorescencia parecieran ser puntos de anclaje, lo cual no se observa cuando el dominio VPS9 de ALS2 es eliminado (Hadano *et al.*, 2001).



Con estos antecedentes, una posible explicación al aumento de la migración e invasión celular dependiente de ALS2, documentada en esta tesis, es que un aumento de ALS2 junto al aumento de Rab5-GTP, tendrían lugar en el frente de avance de las células tumorales expuestas a hipoxia, posiblemente acelerando el recambio de las adhesiones focales y/o el tráfico de integrina  $\beta 1$ , para así promover la migración e invasión de células tumorales.

De esta forma, ALS2, la cual es una proteína estudiada principalmente en patologías neuromotoras, actuaría también como una proteína inductora de características malignas en las células tumorales en condiciones de hipoxia, posiblemente mediante un aumento del tráfico endocítico y reciclaje de distintas proteínas importantes en los eventos de migración celular, promoviendo la supervivencia de las células tumorales.

Un antecedente reciente y respecto a la supervivencia que podría estar induciendo ALS2 en hipoxia, indica que el estrés oxidativo inducido en células tumorales HeLa, altera la morfología de la mitocondria, llevando a la liberación del citocromo c, activación de caspasas y con la consecuente muerte celular por apoptosis (Erler *et al.*, 2006). Bajo estas condiciones de estrés inducido, se observó que el sistema endosomal respondió rápidamente al daño mitocondrial a través de una vía de rescate, en la cual ALS2 activó a Rab5 en la mitocondria, inhibiendo la liberación del citocromo c, disminuyendo el consumo de oxígeno y aumentando así la viabilidad de las células tumorales, lo cual no ocurre en ausencia de ALS2 o Rab5 (Hsu *et al.*, 2018).

Este antecedente podría tener implicancias relevantes, en el contexto de la inducción de ALS2 durante la hipoxia, y la consecuente activación de Rab5 en la supervivencia celular.

#### **4. La expresión de ALS2 es dependiente de la estabilización de HIF-1 $\alpha$**

Actualmente, varios autores han reportado la presencia de altos niveles de HIF-1 $\alpha$  en distintos tipos de cánceres (Pugh & Ratcliffe, 2003). Uno de ellos es el cáncer de células renales claras (RCC), clasificado dentro de un síndrome conocido como la *Enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL)*. Los pacientes que poseen este síndrome, se caracterizan por presentar una mutación en la proteína supresora de tumores VHL, aumentando el riesgo de desarrollar insuficiencia renal y desarrollo de tumores renales de células claras (RCC) y hemangiomas, entre otros (Ollerenshaw *et al.*, 2004, Pugh & Ratcliffe, 2003).

En esta tesis, además del modelo de hipoxia en células de carcinoma pulmonar A549, se usaron además las líneas celulares RCC y RCC<sup>vhl</sup> en condiciones de normoxia, en donde se observó una

diferencia significativa en la expresión de HIF-1 $\alpha$ . Importantemente, esta diferencia en HIF-1 $\alpha$ , resultó ser directamente proporcional a los niveles de ALS2, tanto a nivel de mRNA como de proteína. Además, cabe destacar que estos datos son apoyados mediante el uso de otros modelos celulares utilizando un inhibidor farmacológico de la actividad de HIF-1 $\alpha$  y además el uso de RNAs interferentes contra este factor de transcripción, demostrando así el requerimiento de HIF-1 $\alpha$  en la expresión de ALS2.

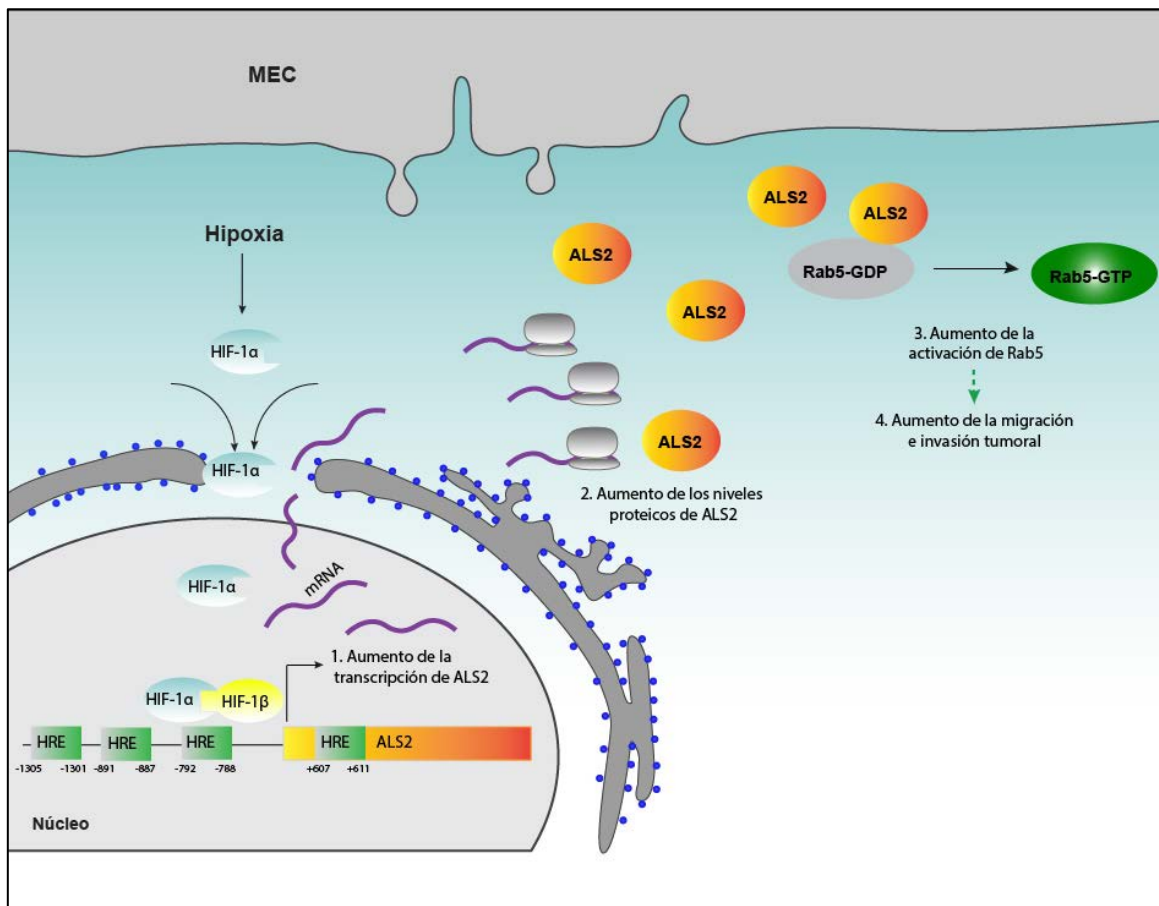
Nuestros hallazgos abren la posibilidad de que ALS2 también podría estar incrementada en muestras clínicas de tumores renales, por lo que resulta muy interesante continuar estudiando este modelo tumoral RCC para conocer si el eje de señalización HIF-1 $\alpha$   $\rightarrow$  ALS2  $\rightarrow$  Rab5-GTP es importante en los distintos mecanismos tumorales para inducir la migración e invasión celular, así como el aumento del tráfico de integrinas  $\beta$ 1 y aumento del recambio de las adhesiones focales entre otros.

***De esta forma, en esta tesis, hemos documentado una ruta de señalización por la cual la hipoxia promovería el aumento de Rab5-GTP, y consecuentemente, la migración e invasión de células tumorales, tal como se observa en el modelo propuesto en la figura 20.***

No obstante, aún quedan interrogantes por aclarar, por lo que proponemos continuar los estudios de ALS2 para llegar a postularlo como un posible marcador y/o blanco tumoral, ya que además de promover la migración e invasión de células tumorales en hipoxia, se ha descrito como un regulador del tráfico endocítico en diversos estudios de cultivos primarios de células neuronales y fibroblastos de ratón.

Dado que el tráfico endocítico es un proceso conservado en distintos tipos celulares y entre especies, siendo regulado por el mismo grupo de proteínas Rabs (Stenmark, 2009) y cuya desregulación potencia eventos relacionados a la progresión tumoral, resulta interesante estudiar a ALS2 en la dinámica endosomal de células tumorales.

De esta manera, esperamos que los datos expuestos en esta tesis aporten para evaluar una posible sobreexpresión de ALS2, una proteína nunca antes estudiada en cáncer, en la progresión y metástasis tumoral, promoviendo la adquisición de diversas características oncogénicas como la migración e invasión celular a través del aumento del tráfico endocítico de distintas proteínas claves en la migración e invasión tumoral.



**Figura 20. Modelo propuesto.** Bajo el estímulo de hipoxia, HIF-1 $\alpha$  se acumula en el citoplasma y se transporta al núcleo, donde heterodimeriza con la subunidad HIF-1 $\beta$ , activando así al factor de transcripción HIF-1, el cual reconoce y se une al HRE ubicado en la región promotora proximal entre los -792 y -788pb de la GEF ALS2 para posteriormente inducir su transcripción. Luego de la síntesis de mRNA, este transloca al citoplasma donde es traducido en los ribosomas. Posteriormente, la proteína ALS2 se une a Rab5 inactivo y promueve la liberación de GDP e incorporación de GTP, activando de esta manera a la GTPasa Rab5 en hipoxia, conduciendo a un aumento de la migración e invasión en células A549.

## X. CONCLUSIONES

**Objetivo Específico 1: Determinar si HIF-1 $\alpha$  induce la activación de Rab5 por estímulos dependientes e independientes de la hipoxia celular.**

Previamente se documentó que la hipoxia aumenta la activación de Rab5, y los hallazgos documentados en esta tesis demostraron que este aumento es un evento regulado por HIF-1, donde la hipoxia solo sería uno de los muchos inductores de la estabilización de HIF-1 $\alpha$  con la consecuente activación de Rab5.

De forma importante y novedosa, la estabilización de HIF-1 sólo produjo un aumento de la activación de Rab5, sin cambios significativos en el nivel de la proteína total, sugiriendo un mecanismo de acción no canónico de HIF-1 sobre Rab5, ya que nunca antes se había demostrado que este factor de transcripción induzca la activación de una proteína sin alterar su expresión.

Estos resultados son evidencia fundamental para postular que la activación de Rab5 por HIF-1 $\alpha$  sería un mecanismo indirecto de activación. De esta manera, los hallazgos de este objetivo abrieron nuevas posibilidades de investigación cada vez más específicas, siendo un paso importante el estudio de posibles moléculas que estuvieran siendo reguladas por HIF-1 $\alpha$  para inducir la activación de Rab5.

**Objetivo Específico 2: Identificar GEFs de Rab5 inducidas por hipoxia y determinar si esta inducción depende de HIF-1 $\alpha$ .**

RIN1, RIN2, RIN3, RABEX-5 y ALS2, todas GEFs de Rab5 poseen HREs putativos, pero los mRNAs codificantes para RIN2 y RIN3 fueron inducidos sólo por hipoxia, y no por HIF1, quedando abierta la posibilidad de realizar más estudios sobre los mecanismos de inducción de estas GEFs por hipoxia, independientemente de HIF-1.

De forma importante, encontramos que la GEF ALS2 resultó ser regulada por HIF-1 a través de una interacción directa, aumentando significativamente su expresión.

Para conocer más sobre el *modus operandis* del desarrollo del cáncer, siempre es prometedor descubrir nuevas moléculas que participen en vías de señalización que promueven la malignidad tumoral a nivel celular.

Así, este es el primer trabajo que relaciona molecularmente a la GEF ALS2, una proteína poco estudiada con una oncoproteína como HIF-1, la cual es reconocida como un regulador maestro de respuestas adaptativas y sobrevivencia tumoral.

Estos hallazgos abren nuevas posibilidades para estudiar y relacionar a ALS2 con los mecanismos clásicos implicados en el desarrollo y propagación tumoral.

***Objetivo Específico 3: Determinar si las GEFs inducidas por HIF-1 $\alpha$  participan en la activación de Rab5, la migración y la invasión de células tumorales en hipoxia.***

Finalmente, a través de este objetivo, encontramos una nueva vía de señalización en células tumorales, la cual inicia con la estabilización de HIF-1 $\alpha$  y posterior translocación nuclear, aumentando la transcripción y posterior síntesis proteica de la GEF ALS2, la cual conlleva a un aumento de los niveles de Rab5-GTP, tanto en normoxia como en hipoxia. Además, documentamos por primera vez, que ALS2 aumenta la migración e invasión de células tumorales en normoxia y de forma más importante aún, es que este aumento es potenciado por la hipoxia y HIF-1. Varios trabajos previos indican la importancia de Rab5 en los eventos de migración celular a través de diferentes mecanismos y en esta tesis, abrimos la posibilidad de que estos eventos también podrían estar siendo regulados por ALS2.

Gracias a los hallazgos de esta tesis, el siguiente nivel será evaluar en muestras de pacientes con cáncer renal de células claras, si la expresión de ALS2 está asociada a incrementos en el nivel de HIF-1 $\alpha$ . Al respecto, datos preliminares derivados de esta tesis indican que muestras tumorales de RCC presentan altos niveles de HIF-1 y ALS2, en comparación a las muestras renales no tumorales (Datos no mostrados).

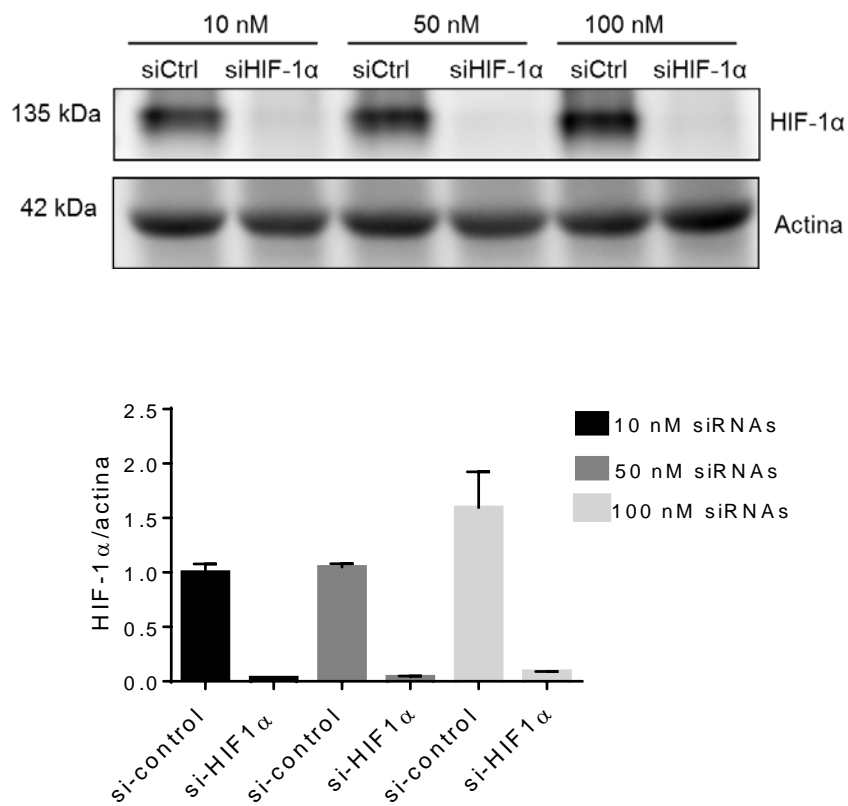
Finalmente, concluimos que siempre es un aporte el descubrimiento de nuevas moléculas expresadas en cáncer, ya que abre nuevas posibilidades de estudio que en un futuro, podrían transformarse en una gran herramienta en el área diagnóstica y terapéutica para los pacientes con cáncer.

## **XI. PROYECCIÓN:**

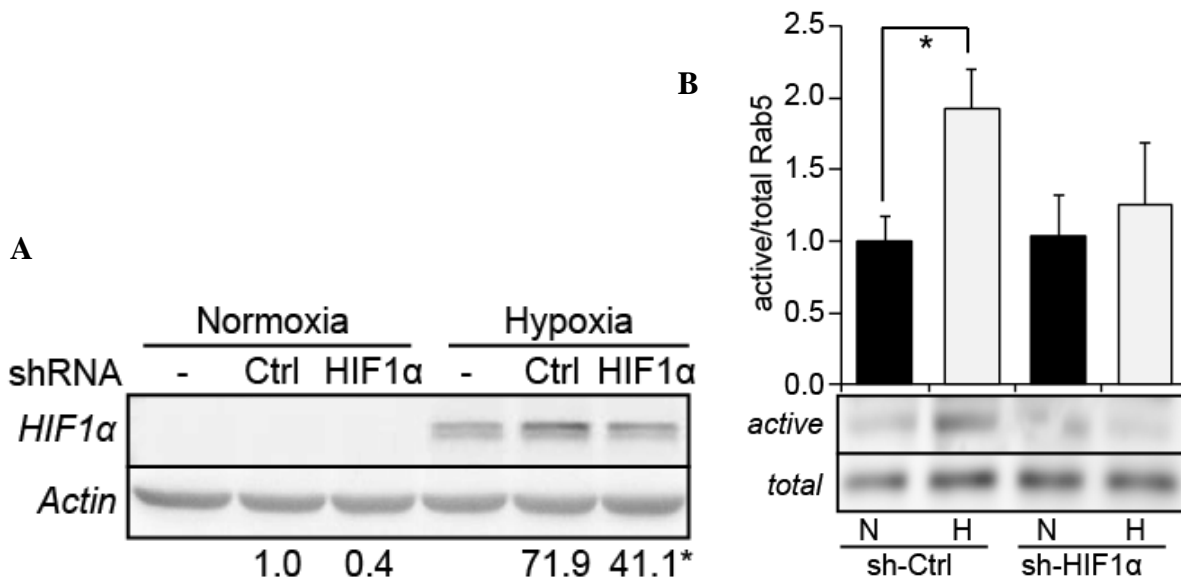
Pese a la magnitud de nuestras observaciones realizadas a nivel molecular y celular, surge la necesidad ineludible de validar estas observaciones en un siguiente nivel, específicamente, en el contexto de muestras de pacientes. Con lo anterior, se espera que el estudio realizado no sea sólo contextualizado a nivel molecular y celular, sino además con un impacto real en lo que estaría ocurriendo en tumores de pacientes con cáncer. Como es difícil y poco específico definir cuando una zona tumoral del tejido de un paciente posee bajos niveles de oxígeno, sobre todo posterior a que este tejido está fijado en formalina y embebido en parafina, una alternativa llamativa es estudiar tumores que posean altos niveles de HIF-1 $\alpha$ . Dentro de estos, uno de los más relevantes son los tumores renales, sobre todo el tipo de células claras, ya que se agrupan dentro de las enfermedades vhl ya que poseen una mutación en la proteína supresora tumoral Von Hippel Lindau (VHL), que como estudiamos previamente, participa en el complejo de degradación proteosomal de HIF-1 $\alpha$  en normoxia. De esta manera, una posibilidad es que estos tumores además de tener altos niveles de HIF-1 $\alpha$  posean también altos niveles de ALS2. Es por esto, que una de las proyecciones importantes de este trabajo es estudiar mediante inmunohistoquímica biopsias de pacientes con cáncer renal (comparado con células renales no tumorales), los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  y ALS2, sobre todo porque las líneas celulares tumorales empleadas en este estudio corresponden a modelos de células humanas, haciendo aún más factible nuestra nueva hipótesis, donde postulamos que los pacientes con cáncer renal poseen altos niveles de HIF-1 $\alpha$  y ALS2.

Por este motivo, nuestro equipo decidió establecer una alianza de colaboración con Médicos patólogos del Hospital San José para estudiar 30 casos de pacientes con cáncer de células claras y 30 muestras de los mismos pacientes correspondientes a zonas renales no tumorales (aprobado por el comité de ética del Hospital San José) y así, evaluar si los niveles de HIF-1 $\alpha$  y ALS2 se correlacionan con el estado de la progresión tumoral de los pacientes con carcinoma renal de células claras.

## XII. ANEXOS



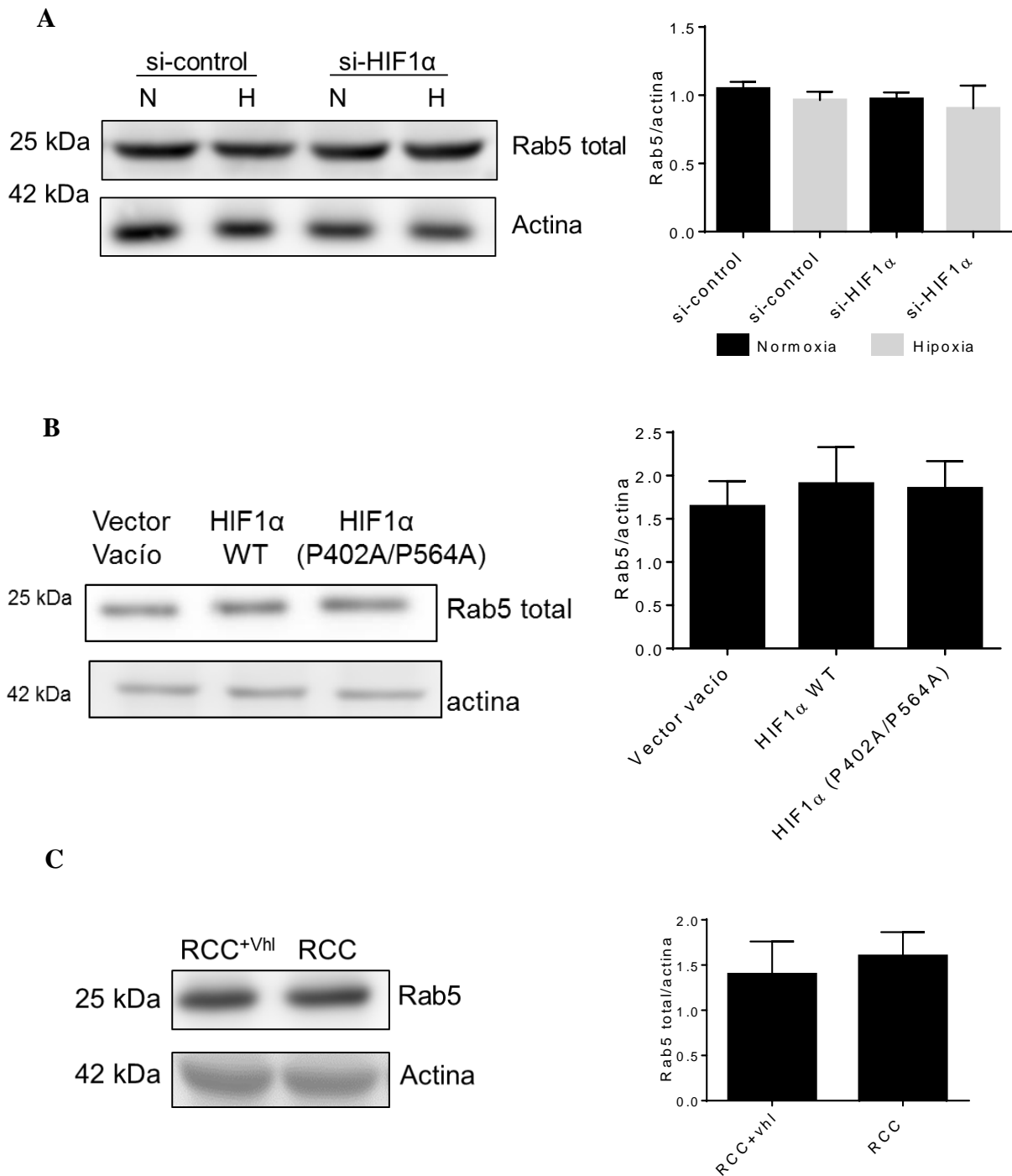
**Figura S1. Curva dosis-respuesta de siRNAs control y HIF-1 $\alpha$  en hipoxia de 24 h.** Previamente, se sembraron 600.000 células para luego transfectarlas por 16 h distintas concentraciones (10 nM- 50 nM- 100 nM) de siRNAs control y siRNAs HIF-1 $\alpha$ . Posteriormente las células fueron incubadas en hipoxia por 24 h para posteriormente cuantificar mediante la técnica de western blot, los niveles de HIF-1 $\alpha$  y actina mediante análisis densitométrico para determinar la concentración de siRNAs más eficiente.



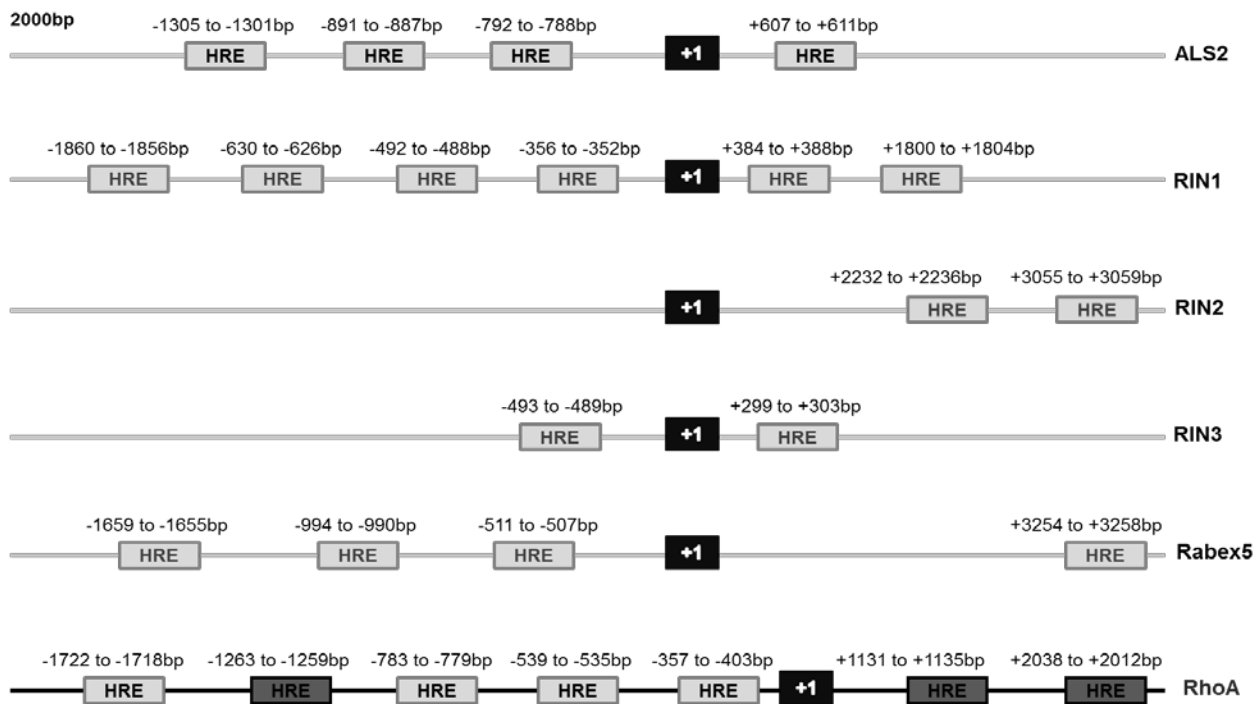
**Figura S2. Las células A549 sh-HIF-1 $\alpha$  disminuyen el 50% de la expresión de Rab5-GTP en hipoxia.**

(A) Las células A549 fueron transducidas con RNAs interferentes de horquilla pequeña contra HIF-1 $\alpha$  (*sh-HIF-1 $\alpha$* ) más su respectivo control (*sh-Ctrl*) y se evaluaron los niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$  normalizados con actina. (B) Para evaluar los niveles de Rab5-GTP se realizó la técnica de pull-down. Los números indican el valor de los datos normalizados. \*P > 0,05. Datos publicados *Oncotarget* 2016 (Silva et al., 2016)





**Figura S3. Cuantificación de los niveles de Rab5 total y actina posterior al silenciamiento, expresión ectópica y endógena de HIF-1 $\alpha$ .** Previamente, se sembraron 600.000 células para luego transfectarlas por 16 h. (A) Se transfectaron 10 nM de siRNAs y se realizó la técnica de western blot. (B) se transfectaron 5  $\mu$ g de los diferentes constructos de HIF-1 $\alpha$  y se realizó la técnica de western blot. (C) Las células RCC y RCC<sup>vhl</sup> crecieron a confluencia y se realizó la técnica de western blot. En todos, para evaluar los niveles de rab5 total y actina. Las gráficas indican el promedio de 3 ensayos independientes  $\pm$  el error estándar (N.S.).



**Figura S4. Análisis *in-silico* de las secuencias promotoras de distintas GEFs de Rab5.** Previamente obtuvimos las secuencias genéticas humanas de distintas GEFs de Rab5 disponibles en la base de datos Ensembl. Posteriormente, se buscaron HREs putativos (5´-(C/G)CGTG-3´) dentro de los primeros 2000 pb del promotor. El +1 indica el sitio de inicio de la transcripción. Hacia la derecha, se observan los nucleótidos río abajo del +1 y hacia la izquierda, los nucleótidos río arriba del +1. Los rectángulos grises claros indican los HREs putativos y los rectángulos gris oscuro indican los elementos validados como HREs del control positivo RhoA; los números sobre los rectángulos indican la posición específica que abarcan los nucleótidos del HRE.

<b>GEFs</b>	<b>N° HREs Promotor</b>	<b>N° HREs Río arriba (+1)</b>	<b>Rol en cáncer</b>
<b>RIN1</b>	6	3	RIN1 muestra propiedades oncogénicas y suprime la apoptosis y su acumulación aberrante se asocia con un pronóstico desfavorable para pacientes con melanoma. (Fang <i>et al.</i> , 2012).
<b>RIN2</b>	0	2	RIN2 forma un complejo con R-Ras y Rab5 para controlar la adhesión endotelial, endocitosis de integrinas y activación de Rac1. (Sandri <i>et al.</i> , 2012).
<b>RIN3</b>	1	1	RIN3 es un regulador negativo de la respuesta de mastocitos a SCF. Janson <i>et al.</i> , 2012.
<b>RABEX-5</b>	3	1	RABEX-5 juega un rol oncogénico en cancer de mama mediante la activación de la vía de MMP-9. (Fang <i>et al.</i> , 2012)
<b>ALS-2</b>	3	1	ALS2 es un nuevo efector de RacGTP por medio de la endocitosis y posterior reclutamiento a frente de avance y macropinosomas. (Kunita <i>et al.</i> , 2007)

---

**Tabla S1.** GEFs de Rab5 que participan en la promoción de características tumorales y poseen varios HREs putativos de HIF-1 5' (A/G-CGTGCT) 3'.

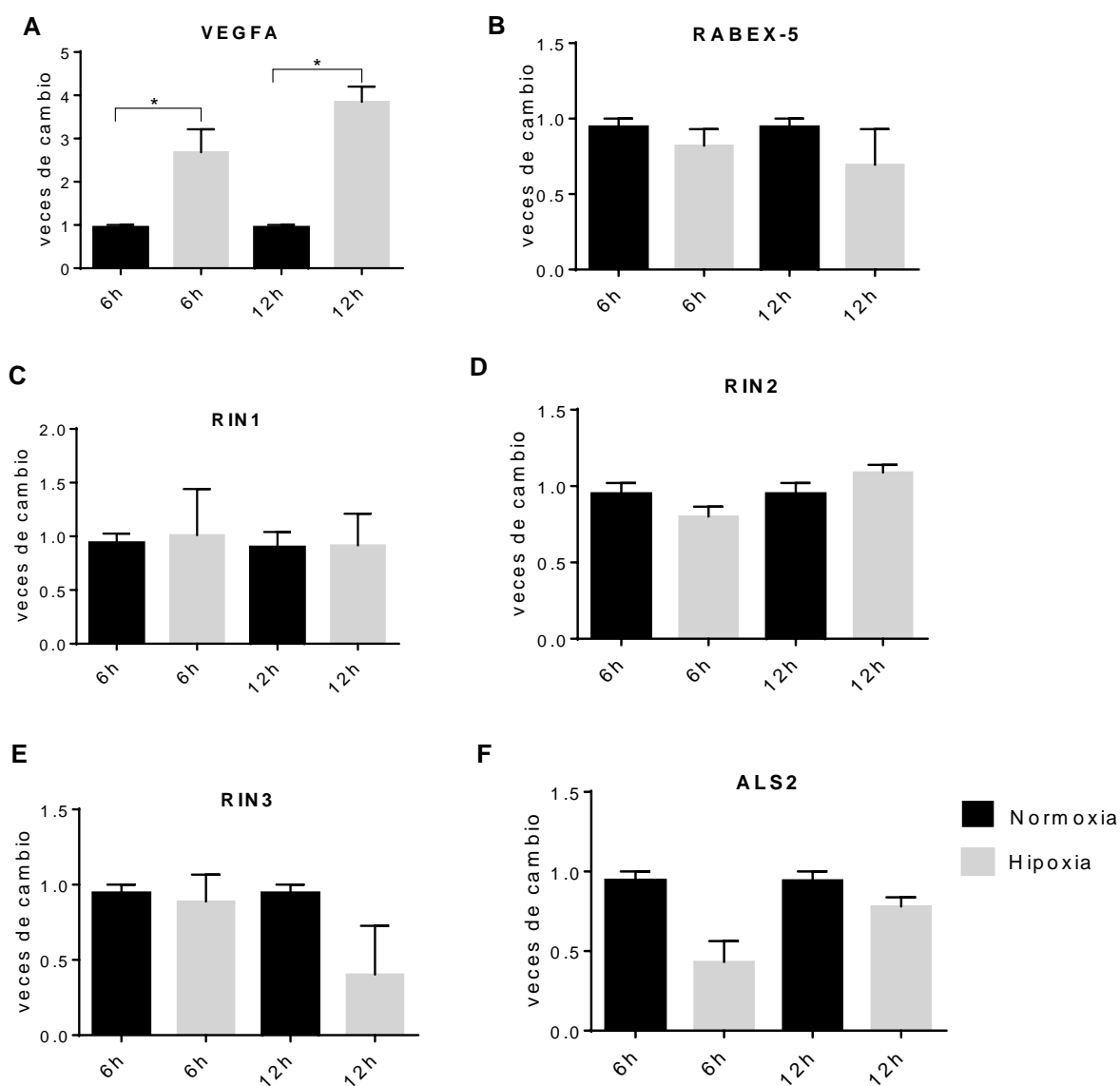
---

<b>GENES</b>			<b>Partidores para cuantificar niveles de mRNA por RTqPCR</b>		
<b>Rabex-5</b>	<b>FW:</b> TGT GCT GTG CTG TGG CTT TCA T		<b>RV:</b> GCT TGA CGC CTA AGC AAG CAT C		
<b>RIN1</b>	<b>FW:</b> GCC TTG CCT TGG GAC TGG AT		<b>RV:</b> AGT AGT GAA GCT GGA CGG GCT		
<b>RIN2</b>	<b>FW:</b> TTG CCT TCC CGC TTC TAC ATG C		<b>RV:</b> TAA AGT TGC CCT TGG CCG AGTT		
<b>RIN3</b>	<b>FW:</b> TGC CTT CGG GAC CCT CAC T		<b>RV:</b> AGC CAG CAT GTT GAC GGA CAC		
<b>ALS2</b>	<b>FW:</b> TCG CCT AAA GGA TGC CAC CTA TGA		<b>RV:</b> TCT CCA TAC CCA TCT TCC AAG CCA		
<b>VEGFA</b>	<b>FW:</b> CTC TAC CTC CAC CAT GCC AAG		<b>RV:</b> AGA CAT CCA TGA ACT TCA CCA CTT		
<b>ACTINA</b>	<b>FW:</b> TGG CAC CCA GCA CAA TGA AGA		<b>RV:</b> GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT		

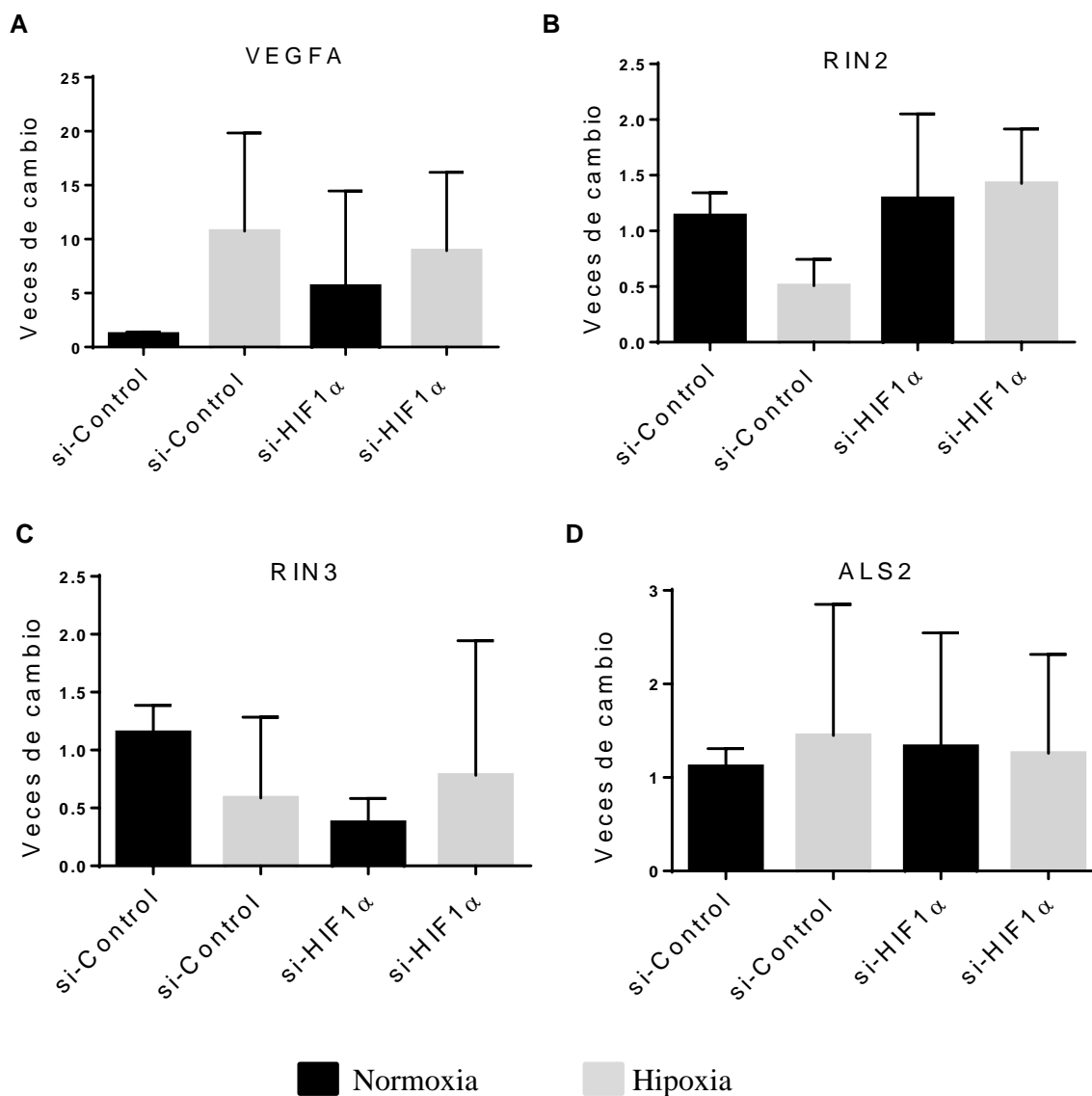
---

**Tabla S2 Diseño de partidores para RT-qPCR para las diversas GEFs en estudio.** Para el diseño de los partidores se obtuvieron las secuencias de cDNA publicadas y comprobadas en pubmed para cada gen y luego se utilizó el programa AmplifX, para diseñar y testear la formación de dímeros y autodímeros. Posteriormente se realiza un PCR in-sílico contra todo el genoma (sin intrones) para comprobar especificidad de los partidores.

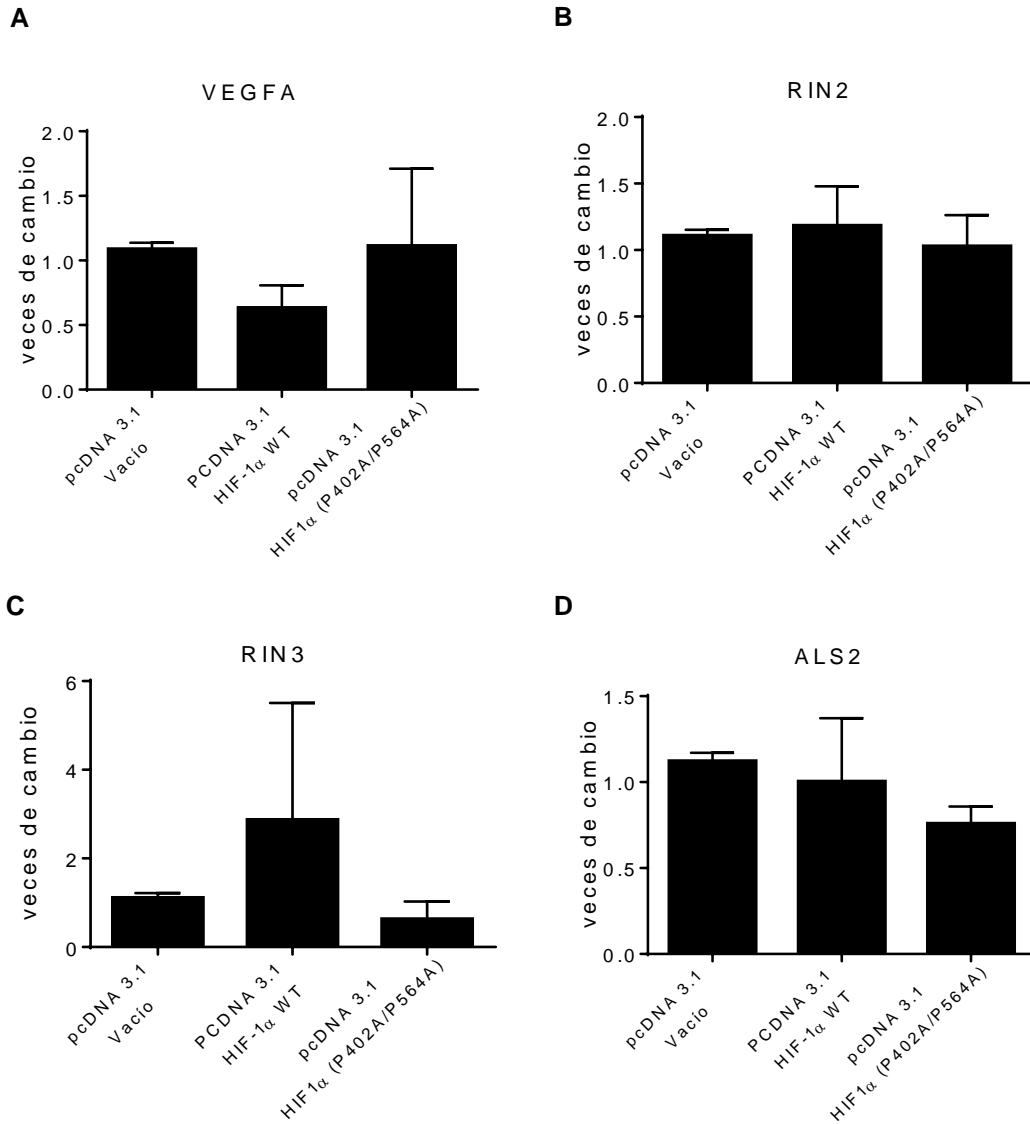
---



**Figura S5. Análisis de los niveles de mRNA de las GEFs de Rab5 en condiciones de normoxia e hipoxia por 6 y 12h.** Las células A549 fueron incubadas en hipoxia y normoxia por 6 y 12 h, inmediatamente se realizó la extracción y purificación de RNA y luego la técnica de RTq-PCR. En cada muestra se cuantificó, (A) La expresión de VEGFA como control positivo. (B) RABEX-5 (C) RIN1 (D) RIN2. (E) RIN3 y (F) ALS2 relativo a los niveles de actina (normalizador) utilizando la ecuación  $\Delta\Delta CT$ . La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos independientes con sus respectivos errores estándar. Los análisis estadísticos fueron realizados con el test one-way ANOVA. (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).



**Figura S6.** Silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  en la evaluación de los niveles de mRNAs de **(A)**VEGFA, **(B)** RIN2, **(C)** RIN3 y **(D)**ALS2 previamente seleccionadas en hipoxia. Resultados no validados ya que control positivo es no significativo. (N=6). Los análisis estadísticos fueron realizados con el test one-way ANOVA.

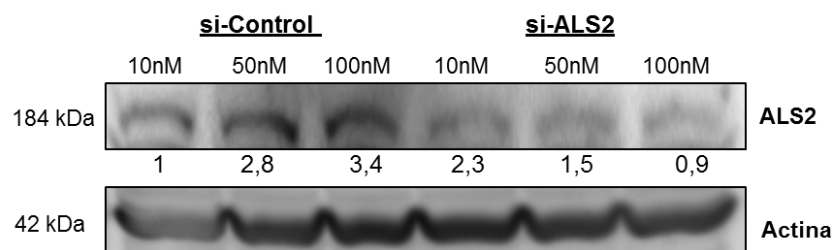


**Figura S7. Transfección pcDNA control (vacío), 3.1 HIF-1 $\alpha$  wt y pcDNA 3.1 HIF-1 $\alpha$  (P402A/P564A)** Posterior a 24 h de transfección con las secuencias codificantes para HIF-1 $\alpha$ , se evaluaron los niveles de mRNAs mediante la técnica de RTqPCR. **(A)** mRNA de VEGFA, **(B)** mRNA de RIN2, **(C)** mRNA de RIN3 y **(D)** mRNA de ALS2. Los resultados no fueron validados ya que control positivo (VEGFA) no es significativo (N=5).

<b>GENES      Partidores para cuantificar el enriquecimiento de HIF-1<math>\alpha</math> por Chip-qPCR</b>		
<b>RhoA</b>	<b>FW:</b> CCTATCCTACAGGCTGCTGAA	<b>RV:</b> TAAGCCCACCAGCTTAATGG
<b>ALS2</b>	<b>FW:</b> GACTGTCTTAGGCTCAGCAATA	<b>RV:</b> TTCACCAACACCCTCAACTC
<b>Actina</b>	<b>FW:</b> CGGCCCAAAGGACTTTTA	<b>RV:</b> TTCCCCTGACTCAGCCTTT

**Tabla S3. Diseño de partidores para Chip qPCR.** Para el diseño de los partidores se realizó a partir de las secuencias genéticas promotoras (-2000 pb), cada GEF publicadas en ensembl.org y luego se diseñaron los partidores limitándose a amplificar el HRE en estudio mediante el programa AmplifX. Para diseñar y testear la formación de dímeros y autodímeros. Posteriormente se realiza un PCR in-sílico contra todo el genoma para comprobar especificidad de los partidores.





**Figura S8. Curva dosis-respuesta y efectividad siRNA-control y siRNA-ALS2 en hipoxia de 24 h.**

Previamente, se sembraron 600.000 células para luego transfectarlas por 16 h distintas concentraciones (10  $\mu$ M- 50  $\mu$ M- 100  $\mu$ M) de siRNAs control y siRNAs ALS2. Posteriormente las células fueron incubadas en hipoxia por 24 h para posteriormente cuantificar mediante la técnica de western blot, los niveles de ALS2 y actina mediante análisis densitométrico para determinar la concentración de siRNAs más eficiente.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Alizadeh AM, Shiri S and Farsinejad S (2014). Metastasis review: from bench to bedside. *Tumour Biol* **35**: 8483-523.
- Bertout JA, Patel SA and Simon MC (2008). The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 967-75.
- Brahimi-Horn MC and Pouyssegur J (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* **581**: 3582-91.
- Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR and Dewhirst MW (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* **56**: 941-3.
- Burkhart DL and Sage J (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* **8**: 671-82.
- Cai H, Shim H, Lai C, Xie C, Lin X, Yang WJ and Chandran J (2008). ALS2/alsin knockout mice and motor neuron diseases. *Neurodegener Dis* **5**: 359-66.
- Carney DS, Davies BA and Horazdovsky BF (2006). Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends Cell Biol* **16**: 27-35.
- Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C and Kieda C (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* **15**: 1239-53.
- Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, Boyer LA, Young RA and Jaenisch R (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 21931-6.
- Chan DA and Giaccia AJ (2007). Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 333-9.
- Chen J, Imanaka N, Chen J and Griffin JD (2010). Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. *Br J Cancer* **102**: 351-60.
- Chi AY, Waypa GB, Mungai PT and Schumacker PT (2010). Prolonged hypoxia increases ROS signaling and RhoA activation in pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* **12**: 603-10.
- Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A and Horwitz AR (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* **10**: 1039-50.
- Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD and Zerial M (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**: 621-5.
- Dang CV and Semenza GL (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* **24**: 68-72.
- Deshpande A, Sicinski P and Hinds PW (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* **24**: 2909-15.
- Devon RS, Helm JR, Rouleau GA, Leitner Y, Lerman-Sagie T, Lev D and Hayden MR (2003). The first nonsense mutation in alsin results in a homogeneous phenotype of infantile-onset ascending spastic paralysis with bulbar involvement in two siblings. *Clin Genet* **64**: 210-5.
- Diaz J, Mendoza P, Ortiz R, Diaz N, Leyton L, Stupack D, Quest AF and Torres VA (2014). Rab5 is required in metastatic cancer cells for Caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasion. *J Cell Sci* **127**: 2401-6.
- Dumas JJ, Zhu Z, Connolly JL and Lambright DG (1999). Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. *Structure* **7**: 413-23.
- Egeblad M, Nakasone ES and Werb Z (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* **18**: 884-901.

Eisinger-Mathason TS, Zhang M, Qiu Q, Skuli N, Nakazawa MS, Karakasheva T, Mucaj V, Shay JE, Stangenberg L, Sadri N, Pure E, Yoon SS, Kirsch DG and Simon MC (2013). Hypoxia-dependent modification of collagen networks promotes sarcoma metastasis. *Cancer Discov* **3**: 1190-205.

Elnitski L, Jin VX, Farnham PJ and Jones SJ (2006). Locating mammalian transcription factor binding sites: a survey of computational and experimental techniques. *Genome Res* **16**: 1455-64.

Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS and Giaccia AJ (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* **440**: 1222-6.

Escobar L (1964). CORFO 25 años de labor inédito. Biblioteca Nacional: Stgo, p. 42.

Fang P, Zhao Z, Tian H and Zhang X (2012). RIN1 exhibits oncogenic property to suppress apoptosis and its aberrant accumulation associates with poor prognosis in melanoma. *Tumour Biol* **33**: 1511-8.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, Znaor A and Bray F (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D and Bray F (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**: E359-86.

Foda HD and Zucker S (2001). Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov Today* **6**: 478-482.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD and Semenza GL (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**: 4604-13.

Frittoli E, Palamidessi A, Marighetti P, Confalonieri S, Bianchi F, Malinverno C, Mazzarol G, Viale G, Martin-Padura I, Garre M, Parazzoli D, Mattei V, Cortellino S, Bertalot G, Di Fiore PP and Scita G (2014). A RAB5/RAB4 recycling circuitry induces a proteolytic invasive program and promotes tumor dissemination. *J Cell Biol* **206**: 307-28.

Gao CF, Xie Q, Su YL, Koeman J, Khoo SK, Gustafson M, Knudsen BS, Hay R, Shinomiya N and Vande Woude GF (2005). Proliferation and invasion: plasticity in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10528-33.

Gilkes DM, Xiang L, Lee SJ, Chaturvedi P, Hubbi ME, Wirtz D and Semenza GL (2014). Hypoxia-inducible factors mediate coordinated RhoA-ROCK1 expression and signaling in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E384-93.

Graham CH, Forsdike J, Fitzgerald CJ and Macdonald-Goodfellow S (1999). Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *Int J Cancer* **80**: 617-23.

Hackenbeck T, Huber R, Schietke R, Knaup KX, Monti J, Wu X, Klanke B, Frey B, Gaipl U, Wullich B, Ferbus D, Goubin G, Warnecke C, Eckardt KU and Wiesener MS (2011). The GTPase RAB20 is a HIF target with mitochondrial localization mediating apoptosis in hypoxia. *Biochim Biophys Acta* **1813**: 1-13.

Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH, Jr., Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR and Ikeda JE (2001). A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* **29**: 166-73.

Hadano S, Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Akatsuka A, Koike M, Aoki M, Uchiyama Y, Itoyama Y and Ikeda JE (2010). Loss of ALS2/Alsin exacerbates motor dysfunction in a SOD1-expressing mouse ALS model by disturbing endolysosomal trafficking. *PLoS One* **5**: e9805.

Hanahan D and Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-74.

Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK and McDonald DM (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* **156**: 1363-80.

Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, Willbanks A and Sarkar S (2015). EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med* **4**: 6.

Hsu F, Spann S, Ferguson C, Hyman AA, Parton RG and Zerial M (2018). Rab5 and Alsln regulate stress-activated cytoprotective signaling on mitochondria. *Elife* **7**.

Hu J, Nie Y, Chen S, Xie C, Fan Q, Wang Z, Long B, Yan G, Zhong Q and Yan X (2017). Leucine reduces reactive oxygen species levels via an energy metabolism switch by activation of the mTOR-HIF-1alpha pathway in porcine intestinal epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* **89**: 42-56.

Huang LE, Gu J, Schau M and Bunn HF (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7987-92.

Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T and Konishi I (2003). Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol* **163**: 1437-47.

Ishikawa T, Nakashiro K, Klosek SK, Goda H, Hara S, Uchida D and Hamakawa H (2009). Hypoxia enhances CXCR4 expression by activating HIF-1 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* **21**: 707-12.

Janson C, Kasahara N, Prendergast GC and Colicelli J (2012). RIN3 is a negative regulator of mast cell responses to SCF. *PLoS One* **7**: e49615.

Kimura H, Weisz A, Ogura T, Hitomi Y, Kurashima Y, Hashimoto K, D'Acquisto F, Makuuchi M and Esumi H (2001). Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem* **276**: 2292-8.

Kimura T, Sakisaka T, Baba T, Yamada T and Takai Y (2006). Involvement of the Ras-Ras-activated Rab5 guanine nucleotide exchange factor RIN2-Rab5 pathway in the hepatocyte growth factor-induced endocytosis of E-cadherin. *J Biol Chem* **281**: 10598-609.

Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P and Semenza GL (2003). Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* **63**: 1138-43.

Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH and Semenza GL (2006). Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res* **66**: 2725-31.

Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S and Ikeda JE (2007). The Rab5 activator ALS2/alsln acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated endocytosis. *J Biol Chem* **282**: 16599-611.

Kusukawa J, Sasaguri Y, Shima I, Kameyama T and Morimatsu M (1993). Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. *Am J Clin Pathol* **99**: 18-23.

Li B, Carey M and Workman JL (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**: 707-19.

Li Y, Qiu X, Zhang S, Zhang Q and Wang E (2009). Hypoxia induced CCR7 expression via HIF-1alpha and HIF-2alpha correlates with migration and invasion in lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* **8**: 322-30.

Liu W, Shen SM, Zhao XY and Chen GQ (2012). Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Mol Biol* **3**: 165-78.

Lunt SJ, Chaudary N and Hill RP (2009). The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clin Exp Metastasis* **26**: 19-34.

Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, Abell A, Johnson GL, Hahn KM and Danuser G (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* **461**: 99-103.

Mendoza P, Diaz J and Torres VA (2014). On the role of Rab5 in cell migration. *Curr Mol Med* **14**: 235-45.

Mendoza P, Ortiz R, Diaz J, Quest AF, Leyton L, Stupack D and Torres VA (2013). Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells. *J Cell Sci* **126**: 3835-47.

Mendoza PA, Silva P, Diaz J, Arriagada C, Canales J, Cerda O and Torres VA (2018). Calpain2 mediates Rab5-driven focal adhesion disassembly and cell migration. *Cell Adh Migr* **12**: 185-194.

Miyazaki Y, Hara A, Kato K, Oyama T, Yamada Y, Mori H and Shibata T (2008). The effect of hypoxic microenvironment on matrix metalloproteinase expression in xenografts of human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* **32**: 145-51.

Muz B, de la Puente P, Azab F and Azab AK (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)* **3**: 83-92.

Nguyen DX, Bos PD and Massague J (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* **9**: 274-84.

Nielsen E, Severin F, Backer JM, Hyman AA and Zerial M (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol* **1**: 376-82.

Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW and Isaka K (2004). Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol* **24**: 6076-83.

O'Toole EA, van Koningsveld R, Chen M and Woodley DT (2008). Hypoxia induces epidermal keratinocyte matrix metalloproteinase-9 secretion via the protein kinase C pathway. *J Cell Physiol* **214**: 47-55.

Okino ST, Chichester CH and Whitlock JP, Jr. (1998). Hypoxia-inducible mammalian gene expression analyzed in vivo at a TATA-driven promoter and at an initiator-driven promoter. *J Biol Chem* **273**: 23837-43.

Ollerenshaw M, Page T, Hammonds J and Demaine A (2004). Polymorphisms in the hypoxia inducible factor-1alpha gene (HIF1A) are associated with the renal cell carcinoma phenotype. *Cancer Genet Cytogenet* **153**: 122-6.

Otomo A, Hadano S, Okada T, Mizumura H, Kunita R, Nishijima H, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Kohiki E, Suga E, Yasuda M, Osuga H, Nishimoto T, Narumiya S and Ikeda JE (2003). ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet* **12**: 1671-87.

Palamidessi A, Frittoli E, Ducano N, Offenhauser N, Sigismund S, Kajiho H, Parazzoli D, Oldani A, Gobbi M, Serini G, Di Fiore PP, Scita G and Lanzetti L (2013). The GTPase-activating protein RNTre controls focal adhesion turnover and cell migration. *Curr Biol* **23**: 2355-64.

Palamidessi A, Frittoli E, Garre M, Faretta M, Mione M, Testa I, Diaspro A, Lanzetti L, Scita G and Di Fiore PP (2008). Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell* **134**: 135-47.

Parsons JT, Horwitz AR and Schwartz MA (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 633-43.

Pellinen T and Ivaska J (2006). Integrin traffic. *J Cell Sci* **119**: 3723-31.

Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S and Comoglio PM (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* **3**: 347-61.

Pescador N, Cuevas Y, Naranjo S, Alcaide M, Villar D, Landazuri MO and Del Peso L (2005). Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene. *Biochem J* **390**: 189-97.

Pugh CW and Ratcliffe PJ (2003). The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Semin Cancer Biol* **13**: 83-9.

Rodriguez H, Drouin R, Holmquist GP and Akman SA (1997). A hot spot for hydrogen peroxide-induced damage in the human hypoxia-inducible factor 1 binding site of the PGK 1 gene. *Arch Biochem Biophys* **338**: 207-12.

- Saito K, Murai J, Kajihō H, Kontani K, Kurosu H and Katada T (2002). A novel binding protein composed of homophilic tetramer exhibits unique properties for the small GTPase Rab5. *J Biol Chem* **277**: 3412-8.
- Sandri C, Caccavari F, Valdembri D, Camillo C, Veltel S, Santambrogio M, Lanzetti L, Bussolino F, Ivaska J and Serini G (2012). The R-Ras/RIN2/Rab5 complex controls endothelial cell adhesion and morphogenesis via active integrin endocytosis and Rac signaling. *Cell Res* **22**: 1479-501.
- Semenza GL (1998). Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin Med* **131**: 207-14.
- Semenza GL (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**: 721-32.
- Sieck G (2013). Physiology in perspective: cell migration and the regenerative process. *Physiology (Bethesda)* **28**: 368-9.
- Silva P, Mendoza P, Rivas S, Diaz J, Moraga C, Quest AF and Torres VA (2016). Hypoxia promotes Rab5 activation, leading to tumor cell migration, invasion and metastasis. *Oncotarget* **7**: 29548-62.
- Spaargaren M and Bos JL (1999). Rab5 induces Rac-independent lamellipodia formation and cell migration. *Mol Biol Cell* **10**: 3239-50.
- Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ and Krek W (2003). Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* **425**: 307-11.
- Stenmark H (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 513-25.
- Storti F, Santambrogio S, Crowther LM, Otto T, Abreu-Rodriguez I, Kaufmann M, Hu CJ, Dame C, Fandrey J, Wenger RH and Hoogewijs D (2014). A novel distal upstream hypoxia response element regulating oxygen-dependent erythropoietin gene expression. *Haematologica* **99**: e45-8.
- Sullivan R and Graham CH (2007). Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 319-31.
- Takahashi Y, Takahashi S, Shiga Y, Yoshimi T and Miura T (2000). Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells. *J Biol Chem* **275**: 14139-46.
- Tang BL and Ng EL (2009). Rabs and cancer cell motility. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**: 365-70.
- Thurman RE, Rynes E, Humbert R, Vierstra J, Maurano MT, Haugen E, Sheffield NC, Stergachis AB, Wang H, Vernet B, Garg K, John S, Sandstrom R, Bates D, Boatman L, Canfield TK, Diegel M, Dunn D, Ebersol AK, Frum T, Giste E, Johnson AK, Johnson EM, Kutuyavin T, Lajoie B, Lee BK, Lee K, London D, Lotakis D, Neph S, Neri F, Nguyen ED, Qu H, Reynolds AP, Roach V, Safi A, Sanchez ME, Sanyal A, Shafer A, Simon JM, Song L, Vong S, Weaver M, Yan Y, Zhang Z, Zhang Z, Lenhard B, Tewari M, Dorschner MO, Hansen RS, Navas PA, Stamatoyannopoulos G, Iyer VR, Lieb JD, Sunyaev SR, Akey JM, Sabo PJ, Kaul R, Furey TS, Dekker J, Crawford GE and Stamatoyannopoulos JA (2012). The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature* **489**: 75-82.
- Torres VA, Mielgo A, Barbero S, Hsiao R, Wilkins JA and Stupack DG (2010). Rab5 mediates caspase-8-promoted cell motility and metastasis. *Mol Biol Cell* **21**: 369-76.
- Tzeng HT and Wang YC (2016). Rab-mediated vesicle trafficking in cancer. *J Biomed Sci* **23**: 70.
- Vaupel P and Mayer A (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* **26**: 225-39.
- Walsh JC, Lebedev A, Aten E, Madsen K, Marciano L and Kolb HC (2014). The clinical importance of assessing tumor hypoxia: relationship of tumor hypoxia to prognosis and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* **21**: 1516-54.
- Wang GL and Semenza GL (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **270**: 1230-7.
- Wang S, Lu A, Chen X, Wei L and Ding J (2014). RABEX-5 is upregulated and plays an oncogenic role in gastric cancer development by activating the VEGF signaling pathway. *PLoS One* **9**: e113891.
- Xue Y, Bi F, Zhang X, Zhang S, Pan Y, Liu N, Shi Y, Yao X, Zheng Y and Fan D (2006). Role of Rac1 and Cdc42 in hypoxia induced p53 and von Hippel-Lindau suppression and HIF1alpha activation. *Int J Cancer* **118**: 2965-72.

- Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC and Wu KJ (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* **10**: 295-305.
- Yatabe N, Kyo S, Maida Y, Nishi H, Nakamura M, Kanaya T, Tanaka M, Isaka K, Ogawa S and Inoue M (2004). HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene* **23**: 3708-15.
- Yoon SO, Shin S and Mercurio AM (2005). Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the alpha6beta4 integrin. *Cancer Res* **65**: 2761-9.
- Yu T, Tang B and Sun X (2017). Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. *Yonsei Med J* **58**: 489-496.
- Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R and Geiger B (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* **9**: 858-67.
- Ziesenis A (2014). Hypoxia and the modulation of the actin cytoskeleton - emerging interrelations. *Hypoxia (Auckl)* **2**: 11-21.