



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO  
INTEGRADO EM MEDICINA**

**ANA RAQUEL MELO BORGES DE CASTRO**

***HIF-1 ALPHA É UM SUBSTRATO DA VIA DA  
UBIQUITINA-PROTEOSSOMA E DA AUTOFAGIA  
MEDIADA POR CHAPERONES***

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:**

**PROF. DR. PAULO PEREIRA**

**DR. JOÃO FERREIRA**

**MARÇO/2011**

TRABALHO FINAL DO 6º ANO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

**HIF-1ALPHA É UM SUBSTRATO DA VIA DA UBIQUITINA-PROTEOSSOMA E  
DA AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONES**

Ana Raquel Melo Borges de Castro

João Vasco Oliveira Ferreira

Hugo Miguel Veríssimo Fôfo

Paulo de Carvalho Pereira

Centro de Oftalmologia e Ciências da Visão, Instituto Biomédico de Investigação da Luz e  
Imagem (IBILI), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

E-mail: [a.raquel.castro@hotmail.com](mailto:a.raquel.castro@hotmail.com)

## Resumo

A via da ubiquitina-proteossoma é considerada a principal via de degradação selectiva de proteínas solúveis nas células eucarióticas. No entanto, os lisossomas desempenham também um papel essencial na degradação de proteínas intracelulares, processo designado de autofagia. Existem três vias autofágicas distintas, macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperones, que diferem entre si mecanisticamente.

A autofagia mediada por chaperones é uma forma selectiva de autofagia. Nesta via, as proteínas citosólicas, que contêm uma sequência peptídica específica, bioquimicamente semelhante ao KFERQ, são primeiro reconhecidas pela chaperone Hsc70 e, posteriormente, dirigidas para a membrana do lisossoma, local onde interagem com a proteína associada à membrana do lisossoma 2A (LAMP-2A). Estes substratos são então desenrolados e translocados para o lúmen do lisossoma, onde são degradados.

Este projecto explora a possibilidade da existência de um diálogo transversal entre a via da ubiquitina-proteossoma e autofagia mediada por chaperones, até há pouco tempo consideradas independentes.

O HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) é um heterodímero composto por uma subunidade estável, o HIF-1 $\beta$ , e uma subunidade lábil, o HIF-1 $\alpha$ . Em condições de normoxia, dois resíduos de prolina presentes no HIF-1 $\alpha$  são hidroxilados e a proteína é ubiquitinada e subsequentemente degradada pelo proteossoma.

Assim, propõe-se que o HIF-1 $\alpha$ , substrato típico da via da ubiquitina-proteossoma, possa em circunstâncias específicas, ser dirigido para a autofagia mediada por chaperones.

De facto, os resultados obtidos neste trabalho mostram que uso de inibidores do lisossoma, mas não os que inibem a macroautofagia, promovem uma estabilização do HIF-1 $\alpha$ . Também foi demonstrado que o HIF-1 $\alpha$  interage com a proteína associada à membrana do lisossoma

2A (LAMP-2A) e que esta interage com a chaperone Hsc70 citosólica. Estas interações aumentam após inibição do proteossoma.

Uma vez que, todos os substratos conhecidos da autofagia mediada por chaperones interagem com a chaperone Hsc70 citosólica e com a proteína associada à membrana do lisossoma 2A (LAMP-2A) podemos inferir que o HIF-1 $\alpha$  é degradado não só pela via da ubiquitina-proteossoma como também pela autofagia mediada por chaperones, mostrando uma possível comunicação entre estas duas vias.

Deste modo, o HIF-1 $\alpha$  poderá constituir um substrato modelo para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na intercomunicação entre estas duas vias proteolíticas.

**Palavras-chave:** Via da Ubiquitina-Proteossoma (VUP); Lisossoma; Autofagia Mediada por Chaperones (AMC); HIF-1 $\alpha$ ; Intercomunicação entre vias proteolíticas

## **Abstract**

The ubiquitin-proteasome system is considered the main pathway for selective degradation of soluble proteins in eukaryotic cells. However, lysosomes also play a key role in the degradation of intracellular proteins, a process called of autophagy. There are three distinct autophagic pathways, macroautophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy, which differ mechanistically.

The chaperone-mediated autophagy is a form of selective autophagy. In this pathway, the cytosolic proteins which contain a specific peptide sequence, biochemically related to KFERQ, are first recognized by the chaperone Hsc70 and subsequently targeted to the membrane of the lysosome, where they interact with the lysosome-associated membrane protein type 2A (LAMP-2A). After undergoing unfolding, the substrates are translocated into the lysosomal lumen, where they are degraded.

HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) is a heterodimer composed of a stable subunit, the HIF-1 $\beta$ , and a labile subunit, the HIF-1 $\alpha$ . Under normoxia, two proline residues in HIF-1 $\alpha$  are hydroxylated and the protein is ubiquitinated and subsequently degraded by the proteasome. In this work it is proposed that HIF-1 $\alpha$ , a typical substrate of the ubiquitin-proteasome system, might be directed to the chaperone-mediated autophagy, under specific circumstances.

Indeed, the present results show that lysosomal inhibitors, but not macroautophagy inhibitors, promote stabilization of HIF-1 $\alpha$ . It was also demonstrated that HIF-1 $\alpha$  interacts with the lysosome-associated membrane protein type 2A simultaneously with the cytosolic chaperone Hsc70. These interactions increased after proteasome inhibition.

Since all known substrates of chaperone-mediated autophagy interact with the cytosolic chaperone Hsc70 and the lysosome-associated membrane protein type 2A, the results suggest

that the HIF-1 $\alpha$  is degraded not only by the ubiquitin-proteasome system but also by chaperone-mediated autophagy, thus highlighting a possible intercommunication between these two pathways.

Therefore, HIF-1 $\alpha$  could be a model substrate for studying the molecular mechanisms underlying the intercommunication between these two proteolytic pathways.

**Keywords:** Ubiquitin-Proteasome System; Lysosome; Chaperone-Mediated Autophagy; HIF-1 $\alpha$ ; Intercommunication between proteolytic pathways

## **Introdução**

Todas as proteínas intracelulares estão continuamente a ser sintetizadas e degradadas [1], sendo a degradação potencialmente tão importante como a síntese no controlo dos níveis de proteínas [2].

A Via da Ubiquitina-Proteossoma (VUP) é considerada a principal via de degradação selectiva de proteínas solúveis nas células eucarióticas. Para este processo é necessária a actividade sequencial de três enzimas: E1, E2 e E3, que conjugam a ubiquitina ao substrato e formam cadeias de poli-ubiquitinas que são reconhecidas como sinal de degradação pelo proteossoma [3-5].

Ao mesmo tempo também ocorre degradação de proteínas no lisossoma, através de diferentes processos, entre os quais, a autofagia (processo de degradação lisossomal de componentes intracelulares) [6].

Existem três formas de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperones (AMC) [7].

Na macroautofagia, os componentes citoplasmáticos são sequestrados para o interior de vesículas com duplas membranas que posteriormente se fundem com o lisossoma [8, 9]. Já na microautofagia, regiões do citoplasma são englobadas por invaginação da própria membrana do lisossoma [10,11].

A AMC é uma forma selectiva de autofagia. Os substratos desta via (proteínas citosólicas) são reconhecidos e dirigidos para o lisossoma para serem degradados [12]. As proteínas contendo o motivo bioquimicamente relacionado com o KFERQ, são reconhecidas pela chaperone citosólica Hsc70 e suas co-chaperones. Posteriormente, este complexo é conduzido para o lisossoma, onde o substrato se liga à proteína associada à membrana do lisossoma 2A (LAMP-2A), que funciona como um receptor para os substratos desta via. Após ser

desenrolado, o substrato é translocado através da membrana lisossómica [13]. Uma forma de Hsc70 intralisossómica é necessária para que o substrato seja translocado para o lúmen do lisossoma, local onde este é rapidamente degradado pelas enzimas lisossómicas [14].

A concepção de que cada proteína é degradada apenas através de uma determinada via proteolítica tem vindo a ser alterada face a evidências recentes, que sugerem que uma proteína pode ser simultaneamente degradada por mais do que um sistema proteolítico. De facto, parece existir um nível de comunicação entre as vias proteolíticas, embora os mecanismos através dos quais esta intercomunicação acontece não estejam completamente elucidados [15]. Neste sentido, este trabalho procura explorar a possibilidade da existência de um diálogo transversal entre a VUP e a AMC, até há pouco tempo consideradas vias proteolíticas independentes. Efectivamente foi demonstrado que várias proteínas podem ser degradadas tanto pela AMC, como pela VUP, nomeadamente a  $\alpha$ -sinucleína [6, 16], I $\kappa$ B [6, 17], o regulador da calcineurina 1 (RCAN 1) [18] e o receptor de membrana EGFR [19]. Recentemente foi demonstrado que o HIF-1 $\alpha$  (“Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ ”), um substrato específico da VUP, pode ser degradado no lisossoma [20], no entanto ficou por esclarecer qual a via lisossomal envolvida. Assim, propõe-se que o HIF-1 $\alpha$  possa, ser degradado através da AMC.

O HIF-1 $\alpha$  é a subunidade lábil do factor de transcrição heteromérico HIF-1, responsável pela resposta celular à hipoxia. O HIF-1 é composto ainda por uma subunidade estável, designada HIF-1 $\beta$  [21]. A actividade do HIF-1 depende, em grande parte, dos níveis de proteína da sua subunidade 1 $\alpha$ .

Em normoxia, o HIF-1 $\alpha$  é hidroxilado em duas prolinas. Uma vez hidroxilado, o HIF-1 $\alpha$  liga-se à proteína von Hippel Lindau (pVHL) que é parte de um complexo E3 ligase. A ligação da pVHL resulta na poliubiquitinação e subsequente degradação proteossomal do HIF-1 $\alpha$ . Deste



modo, em normoxia, os níveis de HIF-1 $\alpha$  são muito reduzidos, impedindo a formação do factor de transcrição HIF-1 [22, 23, 24].

Quando o oxigénio se torna limitante, o HIF-1 $\alpha$  não é hidroxilado e escapa à degradação, acumulando-se nas células. O HIF-1 $\alpha$  é translocado para o núcleo e dimeriza com a subunidade HIF-1 $\beta$ , permitindo a activação da transcrição de mais de 70 genes que ajudam as células a lidar e sobreviver em condições de hipoxia [25, 26].

Este trabalho procura identificar um substrato passível de ser degradado através de VUP e AMC, abrindo a possibilidade para esclarecer alguns mecanismos moleculares envolvidos na comunicação entre estas duas vias.

## **Materiais e métodos**

### Cultura de células

A linha celular do epitélio pigmentado da retina ARPE-19 (LGC Promochem, Teddington, UK) foi cultivada no meio DMEM:F12 (1:1) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina 250ng/ml de anfotericina B) e GlutaMax (1x). O meio, o GlutaMax e os antibióticos foram adquiridos à Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

As células foram mantidas a uma temperatura de 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, em frascos de 75 ml até atingirem a confluência. Quando as células atingiram a confluência, o meio foi removido e adicionou-se 3ml de GIBCO® TrypLE™ (Invitrogen, Carsbad, CA, USA) a cada frasco, incubando durante 3-5 minutos, a 37°C para promover a separação das células. Para interromper a tripsinização adicionou-se 5 ml de meio de cultura e a suspensão foi homogeneizada e transferida para tubos “falcon” para ser centrifugada durante 5 minutos a 1214g. De seguida, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 5 ml de meio, sendo depois transferidas para placas de cultura de 60x15 mm.

Após atingirem a confluência, as células foram tratadas com 10mM de 3-metiladenina (3-MA), 200µM de cloroquina (CQ), 20mM de NH<sub>4</sub>Cl e 100 µM de leupeptina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ou 20µM de MG132 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) durante 8 horas. Antes de efectuar os tratamentos, o meio em que as células cresceram foi substituído por 2ml de meio fresco. As células foram deixadas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> durante o período de incubação.

### Western Blot

Depois dos tratamentos, o meio foi removido, as células foram lavadas duas vezes em solução de PBS (phosphate- buffered saline) e recolhidas em tampão Laemmli (2x), fervidas a 100°C durante 5 minutos e depois sonicadas.

Todos os extractos celulares foram separados por SDS-PAGE e depois transferidos do gel para membranas de PVDF (polyvinylidene fluoride - GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) ou nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, USA). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite magro em TBS-T (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,2% Tween 20, pH 7,6) e marcadas para várias proteínas, usando anticorpos primários específicos e anticorpos secundários conjugados (HRP) adequados. Os anticorpos usados neste trabalho estão enumerados na Tabela I.

As bandas imunorreactivas foram detectadas usando um sistema de quimioluminescência reforçada - ECL (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden).

### Imunoprecipitação

As células ARPE-19 cultivadas em pratos de 60x15mm foram lavadas duas vezes com PBS, raspadas dos pratos e recolhidas em PBS gelado. A suspensão foi centrifugada a 4°C de modo a depositar as células. Em seguida removeu-se o PBS e os pellets foram ressuspensos em 150µl de tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 10mM IOD, 2mM PMSF, 20mM Na<sub>3</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.5% NP-40 e um mini cocktail completo de inibidores de proteases; Roche Applied Science, Indianapolis, USA), incubados durante 30 minutos em gelo e brevemente sonicados.

Depois da centrifugação a 16000g durante 10 minutos, 20µl do sobrenadante foram desnaturados após adição de 20µl de tampão de Laemmli (4x) e aquecimento a 100°C durante 10 minutos. O restante sobrenadante (80µl) foi transferido para novos tubos e a este foram

adicionados 2,5µg de anticorpo policlonal anti-LAMP-2 (Tabela I). Subsequentemente, adicionou-se 300µl de tampão de lise, sem NP-40, à mistura e as amostras foram incubadas durante a noite, a 4°C, sob agitação ligeira. Posteriormente, adicionou-se 50µl de resina proteína G-Sefarose (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) às amostras e procedeu-se à incubação, a 4 °C, durante 2 horas. Em seguida centrifugaram-se as amostras a 3300g e descartou-se o sobrenadante. As amostras foram depois lavadas 3 vezes, por adição de tampão de lise e centrifugação. Finalmente descartou-se o tampão de lise usado na última lavagem e as proteínas imunoprecipitadas foram eluídas da resina com tampão de Laemmli 2x e fervidas a 100 °C.

As amostras eluídas foram carregadas no SDS-PAGE e as análises de Western blot foram realizadas usando anticorpos anti-HIF-1 $\alpha$ , anti-Hsc-70 e anti-LAMP-2 (Tabela I).

Tabela I – Lista de anticorpos primário e secundário usados no Western Blot.

Anticorpo	Hospedeiro	Clone/Cat.#	~MW (kDa)	Diluição	Empresa fornecedora
Anti-HIF-1 $\alpha$	Ratinho	MA1-516	120 kDA	1:1000	Affinity Reagents, Rockford, IL, USA
Anti-LAMP-2	Coelho	512200	$\geq 100$ kDa	1:2000	Zymed-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Hsc70	Rato	1B5	73	1:2000	Stressgen, Farmingdale, NY, USA
Anti-Actina	Ratinho	C4	43	1:100000	Millipore-Chemicon, Billerica, MA, USA

Anti-Ratinho-HRP	Cabra	626520 #	-	1:5000/ 1:20000	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Anti-Coelho-HRP	Cabra	656120 #	-	1:5000/ 1:10000	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Anti-Rato-HRP	Cabra	#81-9520	-	1:8000	Zymed-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

PMW – Peso molecular da proteína

Clone/Cat# - Designação do clone ou número de catálogo dos anticorpos

### Imunocitoquímica

Cultivaram-se as células ARPE-19 em lamelas de uma caixa de 12 poços (foram plaqueadas  $5 \times 10^5$  células/poço).

Na altura apropriada, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas em PBS (1x) e fixadas com formaldeído (PFA) a 4% durante 15 minutos, à temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS (1x) e 500µl de 20mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (em PBS 1x) foi adicionado a cada poço. Passados 10 minutos, as células foram lavadas novamente e depois incubadas em 500µl de uma solução de permeabilização/bloqueio (0,05% de saponina, 0,5% de albumina de soro bovino, BSA, em PBS 1x) durante 15 minutos. As células foram lavadas novamente com PBS (1x) antes da incubação com os anticorpos primários descritos (Tabela II), em solução de permeabilização/bloqueio, durante uma hora e meia, à temperatura ambiente. As lamelas foram então lavadas 3 vezes com a solução de permeabilização/bloqueio e as células foram

incubadas com anticorpos secundários correspondentes (Tabela II), durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Em seguida, as lamelas foram lavadas com a solução de permeabilização/bloqueio e montadas usando o meio de montagem Fluoro-Gel II (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA).

As células foram visualizadas no microscópio de fluorescência Leica DFC350 FX (Leica-Microsystems, Bannockburn, IL, USA).

Tabela II – Lista de anticorpos primário e secundário usados na imunocitoquímica

Anticorpo	Hospedeiro	Clone/Cat.#	Diluição	Empresa fornecedora
Anti-HIF-1 $\alpha$	Ratinho	R960-25	1:200	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-LAMP-2A	Coelho	#A11004	1:100	Molecular Probes - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Ratinho- Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	Cabra	#A11004	1:200	Molecular Probes - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Coelho- Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Cabra	#A11004	1:200	Molecular Probes - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Clone/Cat. # – Designação do clone ou número de catálogo dos anticorpos

## **Resultados**

### **Inibidor do lisossoma induz aumento dos níveis de HIF-1 $\alpha$**

Neste trabalho propõe-se que o HIF-1 $\alpha$ , substrato já conhecido da VUP, seja também um substrato da AMC.

Para comprovar esta hipótese, incubaram-se células ARPE-19 com inibidores do proteossoma, MG-132, e do lisossoma, cloroquina (CQ). A cloroquina é um ácido fraco que, no meio ácido do lisossoma, se comporta como base fraca, o que conduz a um aumento do pH e como consequência conduz à inibição das enzimas lisossomais. Tendo sido descritos três tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia e AMC [6], não foi identificado um inibidor selectivo para a microautofagia ou para a AMC. No entanto, para avaliar se seria a macroautofagia a via de degradação lisossomal que está envolvida na degradação do HIF-1 $\alpha$ , trataram-se as células com 3-metiladenina (3-MA), um inibidor selectivo desta via proteolítica. O 3-MA é um inibidor selectivo da enzima PI3K da classe III que promove a formação do autofagossoma [27]. As células usadas como controlo não tiveram qualquer tipo de tratamento. Os níveis de HIF-1 $\alpha$  foram avaliados por Western blot, após SDS-PAGE e a  $\beta$ -actina foi usada como controlo de carregamento, para verificar se foi carregada sempre a mesma quantidade de proteína.

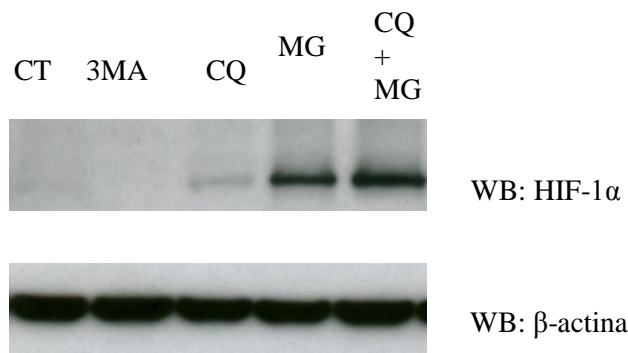


Figura 1 – Células ARPE-19 incubadas na presença de inibidores da degradação lisossomal (CQ), da macroautofagia (3-MA) e do proteossoma (MG-132).

Como se pode ver na figura 1, na situação controlo, sem qualquer inibidor, obtiveram-se níveis muito baixos de HIF-1 $\alpha$ , o que está de acordo com a literatura, uma vez que em condições de normoxia, a subunidade 1 $\alpha$  está constitutivamente a ser degradada [28, 29], presumivelmente pelo proteossoma [22, 30]. Assim, nas células tratadas com o inibidor do proteossoma, MG-132, observou-se um aumento considerável dos níveis de HIF-1 $\alpha$ , tal como descrito anteriormente.

Do mesmo modo, quando se usou a cloroquina (inibidor do lisossoma) obteve-se um aumento dos níveis de HIF-1 $\alpha$  em relação à situação controlo. No entanto este aumento é visivelmente menos acentuado que o obtido após tratamento com MG-132. Este resultado sugere que o HIF-1 $\alpha$  poderá estar a ser degradado no lisossoma, embora a via de degradação predominante seja a VUP. Quando acooplamos a incubação das células com cloroquina e MG-132 a estabilização de HIF-1 $\alpha$  é cumulativa. Deste modo, os resultados sugerem que o HIF-1 $\alpha$  estará a ser degradado simultaneamente no proteossoma e no lisossoma.

Já o tratamento com o inibidor da macroautofagia, 3-MA, não resultou num aumento dos níveis de HIF-1 $\alpha$  em relação à situação controlo. Pelo contrário, este tratamento parece ter conduzido a uma redução dos níveis desta subunidade do factor HIF-1. Por conseguinte, este



resultado parece demonstrar que o HIF-1 $\alpha$  não estará a ser degradado no lisossoma por macroautofagia, mas sim por outra via de degradação lisossomal (AMC ou microautofagia).

### Diferentes tipos de inibidores do lisossoma conduzem a aumento dos níveis de HIF-1 $\alpha$

De modo a excluir a possibilidade do tratamento com cloroquina ter conduzido a acumulação de HIF-1 $\alpha$  de um modo independente da inibição da actividade proteolítica do lisossoma procurou-se avaliar o efeito de outros inibidores do lisossoma (com natureza química e mecanismo de inibição distintos da cloroquina), nos níveis de HIF-1 $\alpha$ . Assim, tratámos células ARPE-19 com leupeptina, NH<sub>4</sub>Cl (ambos inibidores do lisossoma amplamente usados na literatura) e cloroquina e ainda com MG-132. Os níveis de HIF-1 $\alpha$  foram depois avaliados por Western blot. As células foram lisadas com o tampão Laemmli e as amostras separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas PVDF, à qual foram adicionados anticorpos contra o HIF-1 $\alpha$  e a actina.

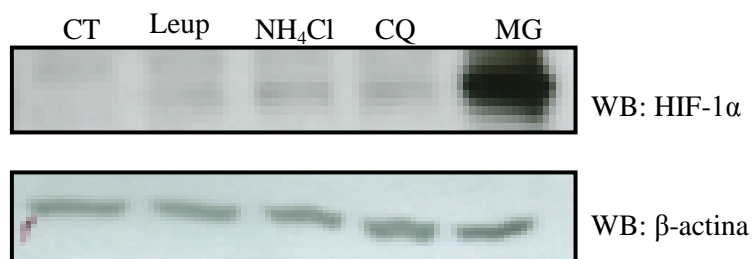


Figura 2 - Células ARPE-19 tratadas com inibidores do lisossoma e do proteossoma.

A leupeptina é um inibidor de proteases lisossomais cisteínicas catepsinas B, H e L [31]. Já o NH<sub>4</sub>Cl, à semelhança da cloroquina, é uma droga lisotrópica que aumenta o pH lisossomal, inibindo as hidrolases ácidas lisossomais [27].

Como podemos ver na figura 2, todos os inibidores do lisossoma utilizados induziram estabilização da subunidade HIF-1 $\alpha$ . A cloroquina e o NH<sub>4</sub>Cl parecem ser mais eficazes que a leupeptina a estabilizar o HIF-1 $\alpha$  (fig. 2). Este resultado vai de encontro ao descrito na

literatura em termos de eficácia de inibição do lisossoma de cada um dos compostos (a leupeptina parece ser menos eficaz a inibir a actividade proteolítica do lisossoma do que a cloroquina ou o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). No entanto, em qualquer destas condições apenas se obteve um aumento ligeiro do HIF-1 $\alpha$  quando comparado com a estabilização obtida após tratamento com MG-132. Deste modo, embora o HIF-1 $\alpha$  pareça estar a ser degradado no lisossoma, esta proteína é predominantemente degradada através da VUP, em condições de normoxia, tal como está estabelecido na literatura [22, 30].

### **LAMP-2 interage com Hsc70 e HIF-1 $\alpha$**

Tendo estabelecido que o HIF-1 $\alpha$  é degradado no lisossoma em células ARPE-19, procurámos determinar, em seguida, qual a via de degradação lisossomal envolvida neste processo. O tratamento com 3-MA (inibidor selectivo da macroautofagia) não conduziu a um aumento dos níveis de HIF-1 $\alpha$  (fig. 3) pelo que se descartou a hipótese de esta subunidade do factor de transcrição HIF-1 estar a ser degradada por macroautofagia. Assim, avaliou-se em seguida se o HIF-1 $\alpha$  seria um substrato para a AMC, que é uma via selectiva de degradação no lisossoma para proteínas solúveis [32, 33].

Todos os substratos conhecidos da AMC interagem com a chaperone Hsc70 citosólica e com a LAMP-2A. [34]. Na AMC, a Hsc70 reconhece selectivamente o motivo KFERQ (sinal de degradação pela AMC) nas proteínas. De facto, a Hsc70 é a única chaperone capaz de reconhecer o motivo KFERQ e o reconhecimento do motivo KFERQ pela Hsc70 direcciona a proteína para degradação no lisossoma [35].

Para a proteína ser translocada para o lúmen do lisossoma, ela tem que ligar-se primeiro ao receptor da AMC, LAMP-2A, na membrana do lisossoma [12, 36]. A LAMP-2A é uma das 3 variantes de “splicing” da proteína LAMP-2, mas é a única que está envolvida na AMC e os

níveis de LAMP-2A na membrana do lisossoma estão directamente correlacionados com a actividade da AMC [12, 37].

De modo a confirmar que nas células ARPE-19 a LAMP-2A interage com a chaperone Hsc70 e com o HIF-1 $\alpha$ , foram efectuados ensaios de co-imunoprecipitação, usando anticorpo anti-LAMP2, em células tratadas com 3-MA, cloroquina e MG-132. As células controlo foram deixadas sem tratamento e as células sem anticorpo (NA) foram tratadas com MG-132 para assegurar a presença de níveis elevados de HIF-1 $\alpha$  na amostra. Em seguida procurou-se avaliar os níveis de LAMP-2, Hsc70 e HIF-1 $\alpha$  por Western blot.

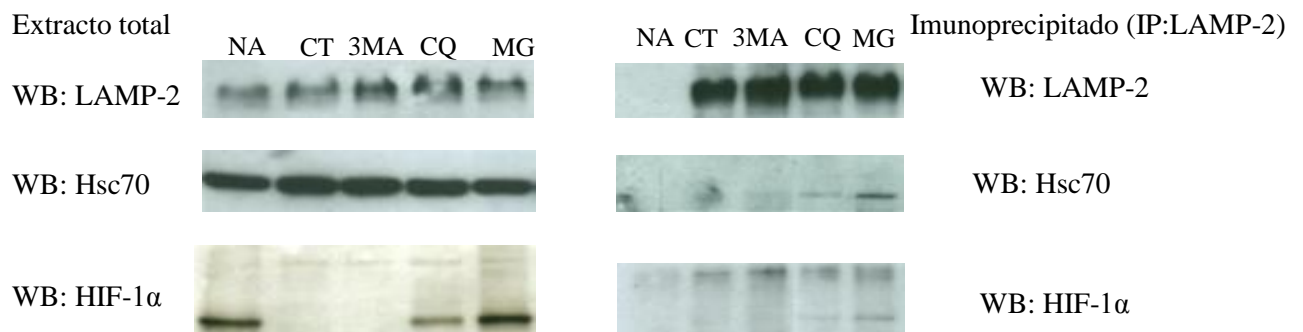


Figura 3 – LAMP-2 interage com Hsc70 e HIF-1 $\alpha$  após tratamento com inibidores do proteossoma (MG-32) e do lisossoma (CQ), em células ARPE-19.

Como é visível na figura 3, quando tratamos as células com inibidores da VUP ou do lisossoma observamos um aumento dos níveis de Hsc70 que co-imunoprecipitam com a LAMP-2 (presumivelmente com a LAMP-2A). Este aumento foi mais evidente após tratamento com MG-132.

Foi também visível a co-imunoprecipitação mais elevada do HIF-1 $\alpha$  com LAMP-2 após tratamento com cloroquina e de uma forma mais acentuada após tratamento com MG-132. Estes resultados, indicam que o HIF-1 $\alpha$  interage com a maquinaria celular necessária para a

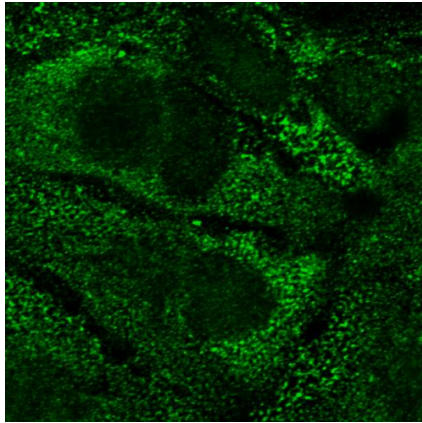
degradação através da via AMC, reforçando a hipótese de que a subunidade  $\alpha$  do factor de transcrição HIF-1 é um novo substrato desta via de degradação lisossomal.

#### **HIF-1 $\alpha$ co-localiza com a LAMP-2A**

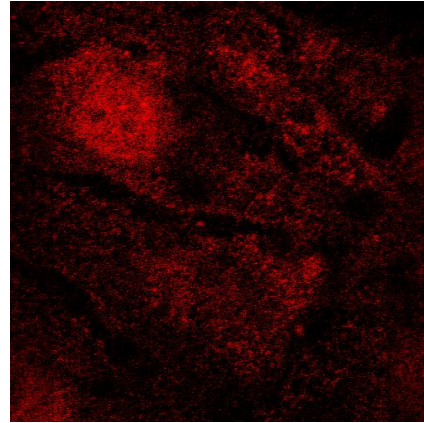
Através de imunocitoquímica verificou-se que o HIF-1 $\alpha$  co-localiza com a LAMP-2A. As células ARPE-19 foram fixadas e marcadas com anticorpos primários específicos contra a LAMP-2A e contra o HIF-1 $\alpha$  e em seguida foram marcadas com anticorpos secundários adequados, tendo a LAMP-2A ficado marcada a verde e o HIF-1 $\alpha$  a vermelho (fig.4).

Como podemos ver na imagem A, a LAMP-2A localizava-se predominantemente no citoplasma das células ARPE-19 enquanto o HIF-1 $\alpha$  (imagem B), encontrava-se principalmente no núcleo.

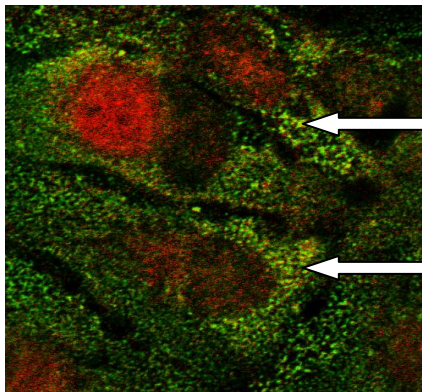
Na imagem C, correspondente à sobreposição das duas imagens, podem-se ver zonas amarelas que correspondem a co-localização entre as duas proteínas no citosol, presumivelmente na membrana lisossomal como seria espectável (setas), o que evidencia que o HIF-1 $\alpha$  estará a ser direccionado para uma via de degradação lisossomal, que será a AMC.



A



B



C

Figura 4 - HIF-1 $\alpha$  co-localiza com a LAMP-2A.

A) Células marcadas para LAMP-2A

B) Células marcadas para HIF-1 $\alpha$ ;

C) Sobreposição da marcação A com B.

## Discussão

HIF 1 é o principal factor de transcrição envolvido na regulação da resposta celular à hipoxia [38]. Em algumas condições patológicas, o HIF-1 tem um papel importante, como por exemplo na patologia neoplásica e na doença isquémica cardiovascular [39-41], tornando assim a regulação do HIF-1 um aspecto central da biologia celular e molecular.

Como descrito anteriormente, a subunidade HIF-1 $\alpha$  está constitutivamente a ser degradada em condições de normoxia, sendo que a via canónica para a sua degradação envolve a hidroxilação das prolinas 402 e 564, seguida da ubiquitinação pela VHL e subsequente degradação pelo proteossoma [42-45].

Demonstrámos que o HIF-1 $\alpha$  também pode ser degradado no lisossoma, tendo-se incubado células ARPE-19 com cloroquina e outros inibidores gerais da degradação lisossomal (fig.1 e fig. 2). No entanto, a acumulação do HIF-1 $\alpha$  obtida com estes inibidores é inferior à obtida quando foi utilizado o inibidor do proteossoma MG-132. Deste modo, os resultados sugerem que o HIF-1 $\alpha$  pode ser degradado no lisossoma, por autofagia, embora de forma menos eficiente do que através da VUP.

Após incubação das células ARPE-19 com MG-132 e cloroquina em simultâneo (fig. 1), obteve-se uma maior estabilização do HIF-1 $\alpha$  do que a resultante do tratamento com cada um dos inibidores em separado. Este resultado indica que esta proteína pode estar a ser degradada simultaneamente através da VUP e no lisossoma, por autofagia.

Os dados obtidos pelas nossas experiências estão de acordo com um trabalho recentemente publicado, no qual também é sugerido que o lisossoma representa um papel importante na degradação do HIF-1 $\alpha$  [20]. No entanto, dado que podem existir três vias autofágicas activas nas células de mamífero, nomeadamente macroautofagia, microautofagia e AMC [6],

procurou-se determinar, em seguida, qual o tipo de autofagia envolvida na degradação do HIF-1 $\alpha$ .

Em contraste com a macroautofagia, a AMC é uma via proteolítica selectiva que requer a translocação de substratos do citoplasma para dentro do lúmen lisossómico [13].

Um dos requerimentos para uma proteína ser considerada um substrato da AMC é a capacidade de interagir com a LAMP-2A [6]. Assim, decidimos investigar através de ensaios de co-imunoprecipitação se o HIF-1 $\alpha$  co-precipitava com a LAMP-2A (fig. 3). Todos os anticorpos disponíveis contra a LAMP-2A reconhecem um epitopo no terminal citosólico da proteína, que está envolvido na ligação com substratos direccionados para degradação no lisossoma por AMC [36], impossibilitando assim o acesso do anticorpo às moléculas de LAMP-2A que estão a interagir com os substratos. Para tentar ultrapassar esta dificuldade decidimos usar um anticorpo que reconhece a região luminal da proteína, que é comum a todas as isoformas (A, B e C) de LAMP-2. No entanto, como a única isoforma envolvida na AMC é a LAMP-2A [12, 37], assumiu-se que o HIF-1 $\alpha$  estaria a co-precipitar com esta isoforma. De facto, por imunocitoquímica observou-se co-localização entre o HIF-1 $\alpha$  e a LAMP-2A (fig. 4). Nesta experiência recorreu-se a um anticorpo específico para a LAMP-2A. Para confirmar que o HIF-1 $\alpha$  precipita selectivamente com a LAMP-2A, poder-se-ia imunoprecipitar o HIF-1 $\alpha$  e verificar se haveria co-precipitação da LAMP-2A e/ou das outras isoformas de LAMP-2.

Ainda em relação às experiências de imunoprecipitação (fig. 3), verificou-se que usando tanto os inibidores da VUP como do lisossoma, ocorreu um aumento dos níveis de HIF-1 $\alpha$  que co-precipitaram com a LAMP-2. O aumento da interacção entre HIF-1 $\alpha$  e a LAMP-2A após tratamento com cloroquina (fig. 3) pode ser resultado da redução da translocação de HIF-1 $\alpha$  para o lúmen do lisossoma, o que levaria a uma acumulação de HIF-1 $\alpha$  ligado a LAMP-2A na superfície do lisossoma, de acordo com o descrito para outros substratos da AMC [46, 47].

No entanto, o maior nível de co-precipitação do HIF-1 $\alpha$  com LAMP-2A resultou do tratamento com o inibidor da VUP. Este resultado poderá ser explicado pelo facto do tratamento com MG-132 conduzir a aumento drástico dos níveis celulares de HIF-1 $\alpha$  (fig. 1 e fig. 2) e, conseqüentemente, a uma maior disponibilidade desta proteína para interacção com a LAMP-2A e subsequente degradação pela AMC. Por outro lado o HIF-1 $\alpha$  pode estar a ser activamente “redireccionado” da VUP para a AMC, por uma proteína ou complexo proteico ainda não identificado. A inibição do proteossoma poderá também estar a conduzir a uma sobre-regulação da AMC, visto que se observou um aumento na interacção de Hsc70 com a LAMP-2 (fig. 3). Como esta chaperone é um componente essencial da AMC e é responsável por conduzir os substratos para a superfície do lisossoma [48], este resultado poderá ser uma evidência de uma intercomunicação entre a AMC e VUP. No entanto, outras experiências terão de ser feitas para avaliar a actividade da AMC após incubação com o MG-132, para confirmar esta hipótese.

A degradação do HIF-1 $\alpha$  pela AMC poderá então ser um mecanismo compensatório. Este mecanismo compensatório pode abranger mais proteínas. Vários estudos demonstraram que há uma disfunção da VUP em vários contextos, por exemplo, foi demonstrado que o stress oxidativo moderado conduz à inibição parcial do proteossoma [49]. Coincidentemente, exposição a stress oxidativo moderado leva à activação da AMC [50].

A diminuição na actividade proteossomal foi também relacionada com o envelhecimento. Adicionalmente, alterações na VUP foram implicadas na patogénese de muitas doenças, incluindo o cancro e distúrbios neurodegenerativos [51]. A activação da AMC, como mecanismo compensatório, pode desempenhar um papel importante nestes contextos.

Ainda em relação ao HIF-1 $\alpha$ , mais estudos são necessários para averiguar em que outros contextos o papel da AMC na degradação do HIF-1 $\alpha$  pode ser relevante, já que outros



mecanismos (dependentes e independentes da VUP) podem estar envolvidos na degradação desta proteína [38, 52-54].

Em resumo, este trabalho fornece evidências de que a inibição da VUP pode conduzir a uma sobre-regulação da AMC, de modo que alguns substratos da VUP (e. g. HIF-1 $\alpha$ ) são direccionados para a degradação lisossómica. De facto, Massey *et al.*, 2008 demonstraram que o bloqueio da AMC, através do silenciamento da LAMP-2A, conduz a uma acumulação de substratos poliubiquitinados, sugerindo assim que pode existir uma comunicação entre a VUP e a AMC [55]. No entanto, evidências de uma comunicação directa entre a AMC e a VUP são limitadas, quando comparadas com as várias evidências que demonstram uma intercomunicação entre a macroautofagia e a AMC. Por exemplo, o bloqueio crónico da AMC conduz à sobre-regulação da macroautofagia e as células com actividade macroautofágica reduzida demonstram uma activação constitutiva da AMC, apoiando um modelo onde existe uma comunicação directa entre estas duas vias autofágicas, no sentido de manter a homeostase proteica. [55-57]. Também a intercomunicação entre macroautofagia e VUP tem sido alvo de grande interesse por parte da comunidade científica recentemente, tendo-se já identificado diversos mecanismos e determinantes moleculares envolvidos neste processo [58, 59].

Concluindo, os resultados obtidos sugerem que existe uma outra via de degradação do HIF-1 $\alpha$  em condições de normoxia, a AMC, e encontramos evidências de comunicação entre a VUP, e a AMC. Serão necessários efectuar mais estudos para esclarecer os mecanismos envolvidos neste processo. Trabalhos futuros ajudarão a esclarecer alguns contextos fisiológicos e patológicos em que o HIF-1 $\alpha$  e estas vias de degradação estão envolvidos.

## **Agradecimentos**

Quero agradecer ao Prof. Paulo Pereira por me ter dado a oportunidade de fazer parte deste projecto e a todas as pessoas do Centro de Oftalmologia do IBILI, que, de algum modo, me ajudaram, muito especialmente ao João Ferreira e ao Hugo Fôfo, pela paciência que tiveram comigo.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional durante todos estes anos, muito obrigada!

## **Bibliografia**

1. Kirschner M: Intracellular proteolysis. *Trends Cell Biol* 9: M42-M45, 1999
2. Fuertes, G., Martin De Llano, J.J., Villarroya, A., Rivett, A.J., and Knecht, E. (2003). Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J* 375, 75-86
3. Ciechanover A (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 17(24): 7151-7160
4. Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428
5. Myung J, Kim KB, Crews CM (2001). The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev* 21(4): 245-273
6. Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 263, 55-72
7. Bandyopadhyay, U., and Cuervo, A.M. (2007). Chaperone-mediated autophagy in aging and neurodegeneration: lessons from alpha-synuclein. *Exp Gerontol* 42, 120-128
8. Geng, J., and Klionsky, D.J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 9, 859-864

9. Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42
10. Marzella, L., Ahlberg, J., and Glaumann, H. (1981). Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 36, 219-234
11. Todde, V., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2009). Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1792, 3-13
12. Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501-503
13. Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2006). Autophagy as a cell-repair mechanism: activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Aspects Med* 27, 444-454
14. Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 14, 70-77
15. Massey, A.C., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2006). Autophagic defects in aging: looking for an "emergency exit"? *Cell Cycle* 5, 1292-1296
16. Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., and Rubinsztein, D.C. (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 278, 25009-25013
17. Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (1998). Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med* 76, 6-12

18. Liu, H., Wang, P., Song, W., and Sun, X. (2009). Degradation of regulator of calcineurin 1 (RCAN1) is mediated by both chaperone-mediated autophagy and ubiquitin proteasome pathways. *FASEB J* 23, 3383-3392
19. Shen, S., Zhang, P., Lovchik, M.A., Li, Y., Tang, L., Chen, Z., Zeng, R., Ma, D., Yuan, J., and Yu, Q. (2009). Cyclodepsipeptide toxin promotes the degradation of Hsp90 client proteins through chaperone-mediated autophagy. *J Cell Biol* 185, 629-639
20. Olmos, G., Arenas, M.I., Bienes, R., Calzada, M.J., Aragonés, J., García-Bermejo, M.L., Landazuri, M.O., and Lucio-Cazana, J. (2009). 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin-J(2) reveals a new pVHL-independent, lysosomal-dependent mechanism of HIF-1alpha degradation. *Cell Mol Life Sci* 66, 2167-2180
21. Weidemann, A., and Johnson, R.S. (2008). Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* 15, 621-627
22. Huang LE, Gu J, Schau M, 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 USA* 95: 7987-7992
23. Ivan M, Kondo k, Yang H, Kim W, Valiando J, et al. (2001) HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 292: 464-468
24. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, et al. (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472

25. Semenza GL, Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol cell Biol* 12: 5447-5454
26. Kimura H, Weisz A, Ogura T, Hitomi Y, Kurashima Y, et al. (2001). Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem* 276: 2292-2298
27. Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., and Seglen, P.O. (2007). Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* 3, 181-206.
28. Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., and Bunn, H.F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271, 32253-32259.
29. Yu, A.Y., Frid, M.G., Shimoda, L.A., Wiener, C.M., Stenmark, K., and Semenza, G.L. (1998). Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol* 275, L818-826
30. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poelliger L: Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274:6519-6525, 1999
31. Seglen, P.O., Grinde, B., and Solheim, A.E. (1979). Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin. *Eur J Biochem* 95, 215-225
32. Majeski, A.E., and Dice, J.F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2435-2444.

33. Massey, A., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2420-2434
34. Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2009). Methods to monitor chaperone-mediated autophagy. *Methods Enzymol* 452, 297-324
35. Cuervo, A.M. (2009). Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab* 21, 142-150
36. Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A.M. (2008). The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol* 28, 5747-5763
37. Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000). Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic* 1, 570-583
38. Liu, Y.V., Baek, J.H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R.N., and Semenza, G.L. (2007). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* 25, 207-217
39. Arjamaa, O., and Nikinmaa, M. (2006). Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res* 83, 473-483
40. Melillo, G. (2004). HIF-1: a target for cancer, ischemia and inflammation--too good to be true? *Cell Cycle* 3, 154-155
41. Rankin, E.B., and Giaccia, A.J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 15, 678-685

42. Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (2000) Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275: 25733-25741
43. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**: 271-275
44. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* **2**: 423-427
45. Zhu K, Dunner K, Jr., McConkey DJ (2010) Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. *Oncogene* **29**: 451-462
46. Aniento F, Roche E, cuervo AM, Knecht E. Uptake and degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by rat liver lysosomes. *J Biol Chem*. 1993 May 15;268(14):10463-70. PubMed PMID: 8486700
47. Terlecky, S.R., and Dice, J.F. (1993). Polypeptide import and degradation by isolated lysosomes. *J Biol Chem* 268, 23490-23495
48. Agarraberes, F.A., and Dice, J.F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* 114, 2491-2499



49. Zhang, C., and Cuervo, A.M. (2008). Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat Med* 14, 959-965
50. Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., and Cuervo, A.M. (2004). Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell* 15, 4829-4840
51. Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Kaushik, S., Massey, A.C., Mazzulli, J., Mosharov, E.V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D.C., Follenzi, A., *et al.* (2008). Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* 118, 777-788
52. Koh, M.Y., Darnay, B.G., and Powis, G. (2008). Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1alpha, leading to its oxygen-independent degradation. *Mol Cell Biol* 28, 7081-7095
53. Luo, W., Zhong, J., Chang, R., Hu, H., Pandey, A., and Semenza, G.L. (2009). Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha but Not HIF-2alpha. *J Biol Chem* 285, 3651-3663
54. Bento CF, Fernandes R, Ramalho J, Marques C, Shang F, *et al.* (2010). The Chaperone-Dependent Ubiquitin Ligase CHIP Targets HIF-1a for Degradation in the Presence of Methylglyoxal. *PLoS ONE* 5(11):e15062. doi:10.1371/journal.pone.0015062
55. Massey, A.C., Follenzi, A., Kiffin, R., Zhang, C., and Cuervo, A.M. (2008). Early cellular changes after blockage of chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 4, 442-456

56. Kaushik, S., Massey, A.C., Mizushima, N., and Cuervo, A.M. (2008). Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy. *Mol Biol Cell* 19, 2179-2192.
57. Massey, A.C., Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2006). Lysosomal chat maintains the balance. *Autophagy* 2, 325-327.
58. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett.* 2010 Apr;584(7):1393-8. Epub 2009 Dec 28 Review. PubMed PMID: 20040365.
59. Lamark, T., and Johansen, T. (2010). Autophagy: links with the proteasome. *Curr Opin Cell Biol* 22, 192-198.