



**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**

**ÂNGELA MARGARIDA FILIPE SIMÕES**

***A FUNÇÃO DA CHIP NA DESTABILIZAÇÃO DO  
HIF-1 $\alpha$  INDUZIDA POR NÍVEIS ELEVADOS DE  
GLICOSE OU METILGLIOXAL***

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:**

**PAULO PEREIRA**

**CARLA FIGUEIRA BENTO**

**MARÇO 2011**

# **A FUNÇÃO DA CHIP NA DESTABILIZAÇÃO DO HIF-1 $\alpha$ INDUZIDA POR NÍVEIS ELEVADOS DE GLICOSE OU METILGLIOXAL**

Ângela Margarida Filipe Simões<sup>1,2</sup>

Carla Alexandra dos Santos Figueira Bento<sup>2</sup>

Rosa Cristina Simões Fernandes<sup>2</sup>

Paulo Carvalho Pereira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; Rua Larga, 3000-504 Coimbra, Portugal

<sup>2</sup> Centro de Oftalmologia e Ciências da Visão, IBILI - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra, Portugal

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Hyperglycemia and tissue ischemia are two main features of most of diabetic complications. It has been suggested that high glucose impairs the cell and tissue adaptation to low oxygen, leading to cell death and tissue dysfunction. The loss of cell response to hypoxia, observed in most of diabetic tissues, appears to result from a destabilization of the transcription factor HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) induced by high levels of glucose or methylglyoxal (MGO), a well-known by-product of glycolysis. However, the molecular mechanisms involved in this process remain elusive.

**Objectives:** This study aims to clarify the molecular mechanisms that may be involved in the destabilization of HIF-1 $\alpha$  in the presence of high glucose or high levels of MGO.

**Methodology:** A human cell line from retinal pigment epithelium (ARPE-19) was used in this study to investigate the role of high glucose or high levels of MGO in the regulation of HIF-1 $\alpha$ . Immunocytochemistry, western blot and immunoprecipitation assays were used to determine the cellular distribution, stability and ubiquitination of HIF-1 $\alpha$ , respectively. We further used short-hairpin RNAs (shRNAs) against CHIP to test the function of this ubiquitin ligase in the destabilization of HIF-1 $\alpha$  in the presence of MGO or high glucose.

**Results:** Data shows that MGO and high glucose induce downregulation of HIF-1 $\alpha$  in ARPE-19 cells, under normoxia and hypoxia conditions. Additionally, results indicate that MGO decreases the accumulation of HIF-1 $\alpha$  into the nucleus, under hypoxia, and decreases the expression of VEGF-A, a well-known target gene of HIF-1. These data suggests that MGO decreases the transcriptional activity of HIF-1, under hypoxia conditions. Data further shows that CHIP, which is an ubiquitin ligase involved in protein quality control mechanisms, has an important role in the ubiquitination and destabilization of HIF-1 $\alpha$  in the presence of increased levels of MGO or high glucose, under hypoxia conditions.

**Conclusions:** This work suggests that the loss of cell response to hypoxia in diabetes might be associated with increased degradation and decreased stability of the transcription factor HIF-1, due to the activation of a mechanism, which involves ubiquitination of HIF-1 $\alpha$  by CHIP, induced by high levels of MGO or high glucose.

## RESUMO

**Introdução:** A hiperglicemia e a isquémia tecidual são duas características importantes de muitas das complicações da diabetes. Tem vindo a ser sugerido que níveis elevados de glicose comprometem a adaptação celular a níveis reduzidos de oxigénio, conduzindo a morte celular e disfunção tecidual. Essa perda de reposta celular à hipoxia, característica da diabetes, parece resultar de uma destabilização do factor de transcrição *Hypoxia Inducible Factor-1* (HIF-1) induzida por níveis elevados de metilglioxal (MGO), um produto secundário da glicólise, ou alta glicose. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo continuam ainda pouco claros.

**Objectivos:** Este trabalho tem como objectivo esclarecer alguns dos mecanismos moleculares que podem estar na origem da destabilização do HIF-1 $\alpha$  na presença de alta glicose ou níveis elevados de MGO.

**Metodologia:** Neste trabalho foi usada uma linha celular humana de epitélio pigmentado da retina (ARPE-19) para testar os efeitos da alta glicose ou níveis elevados de MGO na expressão de HIF-1 $\alpha$ . Foram usadas técnicas de imunocitoquímica, western-blot e imunoprecipitação para determinar a localização celular, estabilização e ubiquitinação do HIF-1 $\alpha$ , respectivamente. Foram ainda testados *short-hairpin RNAs* (shRNAs) contra a CHIP, para testar a função desta ligase de ubiquitina na destabilização do HIF-1 $\alpha$  na presença de MGO ou alta glicose.

**Resultados:** Os resultados obtidos mostram que o MGO e concentrações elevadas de glicose diminuem os níveis de HIF-1 $\alpha$ , em células ARPE-19, em condições de normoxia e hipoxia. Verificou-se ainda que o MGO diminui a acumulação de HIF-1 $\alpha$  no núcleo e diminui a expressão de VEGF-A, um gene alvo do HIF-1, o que poderá indicar uma diminuição da actividade de transcrição deste factor. Os resultados indicam ainda que a CHIP, uma ligase de

ubiquitina envolvida no controlo de qualidade proteica, tem uma função importante na ubiquitinação e destabilização do HIF-1 $\alpha$  na presença de níveis elevados de MGO ou glicose em condições de hipoxia.

**Conclusões:** Este trabalho sugere que a perda de resposta celular à hipoxia na diabetes pode estar associada a um aumento da degradação e diminuição da estabilidade do factor de transcrição HIF-1, através de um mecanismo que envolve a sua ubiquitinação, pela ligase de ubiquitina CHIP, induzida por níveis elevados de MGO ou alta glicose.

## **PALAVRAS-CHAVE**

*Carboxy terminus of the Hsp70-Interacting Protein (CHIP)*

Diabetes

Hiperglicemia

Hipoxia

*Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1)*

Metilglioxal (MGO)

Proteína Von Hippel Lindau (pVHL)

Proteossoma

Ubiquitina

*Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*

## INTRODUÇÃO

A disfunção vascular é uma das principais alterações associadas à diabetes, sendo caracterizada por alterações progressivas na microvascularização, aumento da permeabilidade vascular, oclusão capilar e formação de regiões isquémicas, podendo levar a processos de morte celular e disfunção tecidual.

Sabe-se que a disfunção endotelial na diabetes está em larga medida associada a alterações na resposta celular a situações de isquémia, a qual é regulada principalmente pelo factor de transcrição HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*) (Semenza et al. 1991). O HIF-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 do HIF-1 $\alpha$  (P402 e P564) são hidroxilados, o que permite o seu reconhecimento pela ligase de ubiquitina VHL (*von hippel lindau*), que induz poliubiquitinação do HIF-1 $\alpha$  e a sua subsequente degradação pelo proteossoma (Salceda & Caro 1997; Huang et al. 1998; Maxwell et al. 1999; Ivan et al. 2001; Jaakkola et al. 2001). Em condições de hipoxia, o HIF-1 $\alpha$  não é hidroxilado e, como consequência, não é degradado, acumulando-se no núcleo, onde dimeriza com o HIF-1 $\beta$  e leva à transcrição de mais de 70 genes envolvidos na resposta celular à hipoxia, sendo de destacar o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Forsythe et al. 1996; Kimura et al. 2001).

Alguns estudos anteriores sugerem que os níveis elevados de glicose na diabetes comprometem a estabilidade do HIF-1 $\alpha$ , diminuindo a capacidade das células se adaptarem a situações de isquémia (Bento et al. 2010a; Bento et al. 2010b). Foi, ainda, demonstrado que pacientes diabéticos apresentam diminuição da resposta arteriogénica desencadeada por episódios de isquémia do miocárdio (Abaci et al. 1999) e que os níveis de HIF-1 $\alpha$  estão diminuídos em biopsias de úlceras de doentes diabéticos quando comparadas com biopsias de



úlceras venosas não diabéticas que partilham o mesmo ambiente isquémico (Catrina et al. 2004). Estes e outros estudos sugerem que o efeito da hiperglicemia é determinante na diminuição da resposta celular em situações de hipoxia na diabetes. No entanto, os mecanismos moleculares associados a essa perda de resposta continuam ainda pouco claros.

Alguns resultados recentes sugerem que concentrações elevadas de glicose conduzem a um aumento da produção e acumulação intracelular de metilglioxal (MGO), levando a uma rápida degradação do HIF-1 $\alpha$  em condições de hipoxia por uma via independente da hidroxilação das prolinas e da VHL (Bento et al. 2010a). Estes resultados são importantes uma vez que podem ter implicações importantes na fisiopatologia de muitas complicações associadas à diabetes. O MGO é um produto secundário da glicólise altamente reactivo, capaz de reagir com grupos amina livres de resíduos de lisina e arginina nas proteínas, levando à formação de produtos avançados de glicação (AGEs) (Kalapos 1999; Ramasamy et al. 2006). Sabe-se, ainda, que o aumento dos níveis de MGO está associado a alteração de diversas vias de sinalização celulares importantes (Portero-Otin et al. 2002; Du et al. 2006) e que níveis elevados de AGEs comprometem o processo angiogénico num modelo de retinopatia induzida por isquémia (Stitt et al. 2005).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que o MGO, de facto, diminui os níveis de HIF-1 $\alpha$  e de VEGF em resposta à hipoxia, em células do epitélio pigmentado da retina, o que sugere uma diminuição da actividade de transcrição do HIF-1, uma vez que o VEGF é um dos genes alvo deste factor de transcrição. Verificou-se ainda que a CHIP (*Carboxy terminus of the Hsp70-Interacting Protein*) tem uma função importante no processo de ubiquitinação e degradação do HIF-1 $\alpha$  em condições de hipoxia, na presença de níveis elevados de glicose ou MGO. Neste trabalho sugere-se que a degradação do HIF-1 $\alpha$  na presença de alta glicose ou níveis elevados de MGO compromete a adaptação celular e tecidual em condições de

isquémia, o que pode estar na origem da disfunção vascular observada na retinopatia diabética e noutras complicações associadas à diabetes.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Cultura de células e tratamentos**

A linha celular humana do epitélio pigmentado da retina ARPE-19 (LGC Promochem Teddington, UK) foi mantida a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, e cultivada em meio DMEM:F12 (1:1), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 250 ng/ml de anfotericina B) e glutamax (1x). As células de carcinoma renal RCC4 VHL<sup>-/-</sup> (cedidas pelo Dr. C. Buys do Centro Médico Universitário de Groningen, Holanda) foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% FBS, antibióticos e glutamina, numa atmosfera a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os meios, glutamax/glutamina e antibióticos foram adquiridos à Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Quando necessário, as células foram tratadas com os seguintes agentes: 350 µM de cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich) e 1-3 mM de metilglioxal (MGO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os tratamentos de hipoxia (5% CO<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub>, 93% N<sub>2</sub>, 37°C) foram realizados numa incubadora Nuair N4950E com controlo de gás (Nuair, Plymouth, MN, USA).

### **Western Blot**

Após os tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com uma solução de tampão fosfato (PBS) e recolhidas em tampão de Laemmli (2x). Os lisados celulares foram subsequentemente desnaturados a 100°C durante 5 minutos e brevemente sonicados. As proteínas desnaturadas foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). As proteínas no gel foram, de seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia), durante 1 hora a 100 volts. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em 5% de leite em

TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,2% Tween20, pH 7,6) durante 1 hora com agitação à temperatura ambiente, e incubadas com o anticorpo primário, devidamente diluído numa solução de 5% de leite (em TBS-T), durante 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens, de 10 minutos cada, com TBS-T, as membranas foram posteriormente incubadas durante 1 hora, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário, devidamente diluído em 2,5% de leite (em TBS-T). A detecção das proteínas marcadas com anticorpos foi realizada usando o sistema de quimioluminescência “ECL Western Blotting Detection Kit” (GE Healthcare Bio-Sciences, Upssala, Suécia). Neste procedimento foram usados os seguintes anticorpos: *mouse anti-HIF-1 $\alpha$  clone H1alpha67* 1:500 (Abcam, Cambridge, UK), *mouse anti-actin clone C4* 1:1000 (Millipore-Chemicon, Billerica, MA, USA), *mouse anti-ubiquitin clone P4DI* 1:1000 (Covance, Princeton, NJ, USA), *goat anti-STUB1/CHIP* 1:500 (Abcam, Cambridge, UK), *rabbit anti-VEGF-A (Ab-4)* 1:300 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), *horseradish peroxidase-conjugated secondary goat anti-mouse, goat anti-rabbit e rabbit anti-goat* 1:7500 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Os resultados de western-blot foram quantificados usando o software *GelPro Analyzer* (Media Cybernetics, Inc, MD, USA).

### **Imunocitoquímica**

As células ARPE-19 foram cultivadas em lamelas. Após os tratamentos adequados, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% durante 10 minutos. De seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e procedeu-se à sua permeabilização com Triton X-100 a 1% (v/v) durante 10 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas e bloqueadas com soro de cabra (1:10) durante 20 minutos. Subsequentemente, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário anti-HIF-1 $\alpha$  clone H1alpha67 (1:50; Abcam, Cambridge, UK) durante uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as lamelas foram lavadas 3 vezes com PBS, tendo cada lavagem uma duração de 5 minutos. De seguida,

as células foram incubadas com o anticorpo secundário Texas Red-conjugated goat anti-mouse (1:100) e DAPI (1:5000) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) durante uma hora à temperatura ambiente. De seguida, as lamelas foram lavadas 3 vezes com PBS, durante um período de 5 minutos cada lavagem. Colocaram-se as lamelas em meio de montagem com Glycergel (Dako, Glostrup, Dinamarca), sendo depois analisadas por microscopia de fluorescência (Leica DMIRE2, Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA).

### **Imunoprecipitação**

Células RCC4 VHL  $-/-$ , cultivadas em placas de  $60 \times 15$  mm e previamente tratadas, foram lavadas duas vezes com PBS, raspadas em PBS frio e depois recolhidas para tubos de centrifugação. As células foram centrifugadas a 5000 g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e os pellets celulares foram ressuspensos em 100  $\mu\text{l}$  de tampão de lise [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM IOD, 2 mM PMSF, 20 mM  $\text{Na}_3\text{MoO}_4$ , 0.5% NP-40 e cocktail completo de inibidores de proteases (Roche Applied Science, Indianapolis, USA)]. Os lisados foram incubados durante 30 minutos em gelo e, de seguida, brevemente sonicados. Após centrifugação a 16000 g durante 10 minutos, 20  $\mu\text{l}$  de sobrenadante foram desnaturados em 20  $\mu\text{l}$  de tampão de Laemmli (2x) a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos (“input”). Ao restante sobrenadante (80  $\mu\text{l}$ ), previamente transferido para um novo tubo de centrifugação, foram adicionados 2,5  $\mu\text{g}$  de anticorpo anti-HIF-1 $\alpha$ . Em seguida, 300  $\mu\text{l}$  de tampão de lise, sem NP-40, foram adicionados às amostras, sendo estas subsequentemente incubadas durante a noite a  $4^{\circ}\text{C}$  com agitação. Posteriormente, adicionaram-se 50  $\mu\text{l}$  de proteína G Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia) às amostras e procedeu-se à sua incubação a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. As amostras foram lavadas 3 vezes com tampão de lise e centrifugadas. As proteínas imunoprecipitadas foram eluídas da resina com tampão de Laemmli (2x) e desnaturadas a

100°C durante 5 minutos. Os imunoprecipitados e os “inputs”, equivalentes aos extractos totais, foram analisados por Western blot usando anticorpos anti-HIF-1 $\alpha$  e anti-ubiquitina.

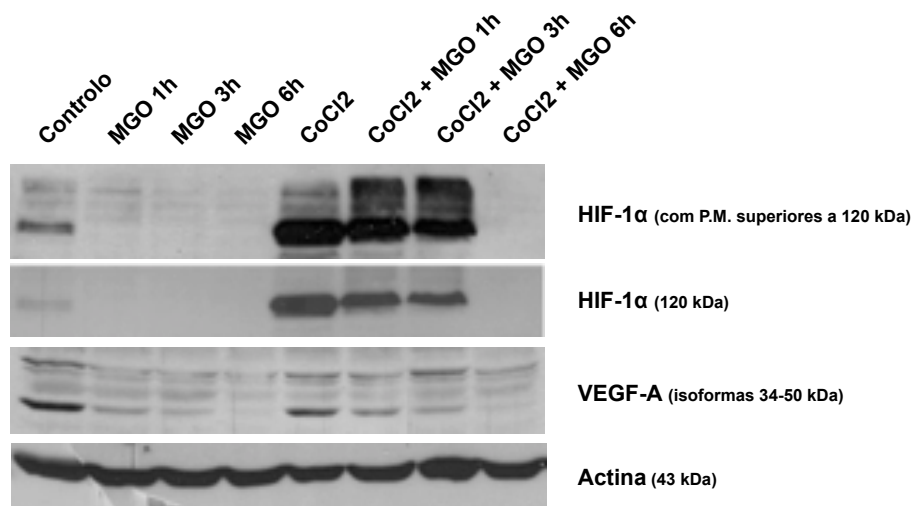
## RESULTADOS

Alguns resultados anteriores, obtidos por este e outros grupos, sugerem que os níveis elevados de glicose e MGO na diabetes comprometem a regulação do HIF-1 (Catrina et al. 2004; Ceradini et al. 2008; Bento et al. 2010a; Bento et al. 2010b), a proteína chave na regulação da resposta e sobrevivência celular face a níveis reduzidos de oxigénio, podendo assim explicar a perda de resposta celular à hipoxia na diabetes.

De forma a compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo, células ARPE-19 foram incubadas com  $\text{CoCl}_2$  na presença ou ausência de MGO e os níveis de HIF-1 $\alpha$  foram determinados por western blot. De acordo com os resultados obtidos na Figura 1 é possível confirmar que o  $\text{CoCl}_2$ , um antagonista do ferro, induz acumulação de HIF-1 $\alpha$  nas células, mimetizando os efeitos induzidos por níveis reduzidos de oxigénio. Sabe-se que o  $\text{CoCl}_2$  inibe as hidroxilases de prolina PHDs, que requerem oxigénio e ferro (entre outros) como substratos, inibindo a hidroxilação das prolinas do HIF-1 $\alpha$ , o que conduz a uma acumulação da proteína nas células por inibição do processo de ubiquitinação induzido pela VHL (Epstein et al. 2001; Yuan et al. 2003; Salnikow et al. 2004; Schofield & Ratcliffe 2005). Os resultados da Figura 1 mostram, ainda, que a incubação das células com MGO leva a uma destabilização dos níveis de HIF-1 $\alpha$ , tanto em condições normais, como na presença de  $\text{CoCl}_2$ . Verifica-se, ainda, que essa destabilização depende do tempo de incubação das células com MGO, sendo mais pronunciada para tempos prolongados de incubação. Deve destacar-se o facto do MGO aumentar a acumulação de bandas de alto peso molecular que apresentam reactividade para anticorpos específicos contra o HIF-1 $\alpha$ , o que sugere acumulação de formas ubiquitinadas da proteína nessas condições. Esse resultado parece indicar que a presença de MGO induz ubiquitinação do HIF-1 $\alpha$ , mesmo na presença de  $\text{CoCl}_2$ , sugerindo ubiquitinação

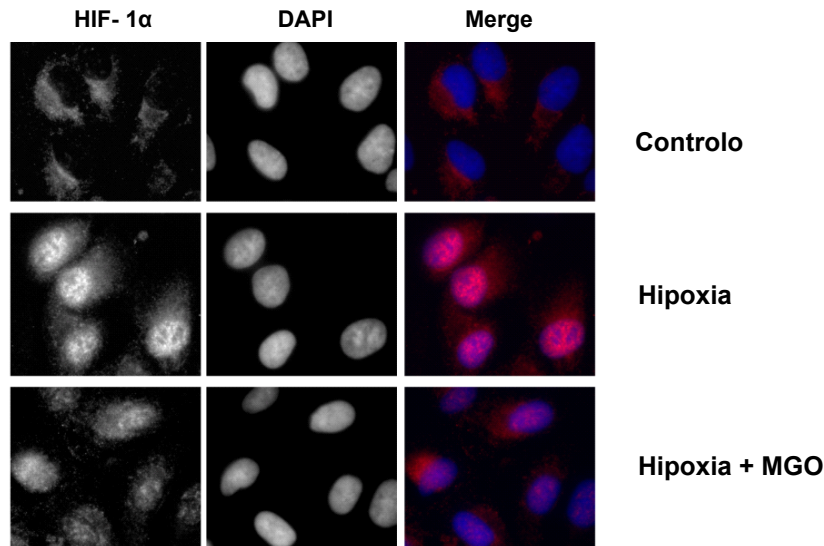
do HIF-1 $\alpha$ , e a sua subsequente degradação, através de uma via independente das PHDs e da VHL.

Os resultados de imunocitoquímica da Figura 2 confirmam os resultados obtidos por western blot representados na Figura 1 e mostram claramente que o MGO diminui os níveis de HIF-1 $\alpha$  nas células, especificamente ao nível da região nuclear, o que poderá indicar uma diminuição da actividade de transcrição do HIF-1. De acordo com os resultados anteriores, a incubação das células com MGO leva também a uma diminuição dos níveis de VEGF-A, sobretudo da isoforma de menor peso molecular (VEGF-A<sub>121</sub>) (Figura 1), que se sabe ser uma isoforma difusível, quando secretada para o meio extracelular, e que tem elevado potencial angiogénico. Esta diminuição poderá estar associada à diminuição dos níveis de HIF-1 $\alpha$  e diminuição da actividade de transcrição do HIF-1, uma vez que este factor é um dos principais envolvidos na expressão de VEGF-A nas células.



**Figura 1. Níveis elevados de MGO diminuem os níveis proteicos de HIF-1 $\alpha$  e de VEGF-A em condições de normoxia e de hipoxia.** Células ARPE-19 foram tratadas com CoCl<sub>2</sub> (350  $\mu$ M) durante 6 horas e com MGO (3 mM) durante 1, 3 ou 6 horas. Os lisados celulares foram analisados por western blot usando anticorpos específicos contra o HIF-1 $\alpha$ , o VEGF-A e a actina; P.M. – pesos moleculares.

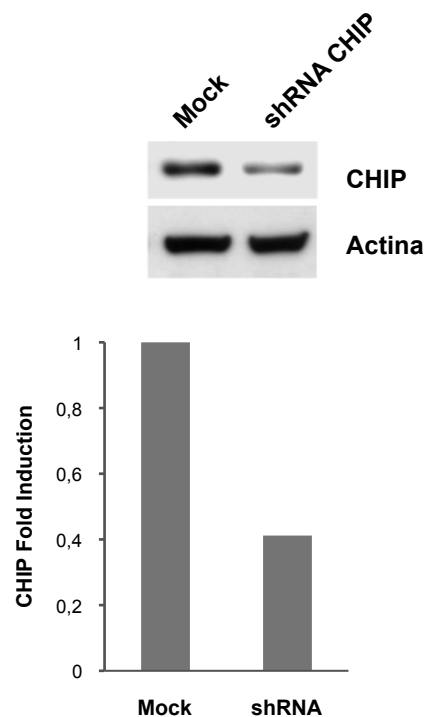




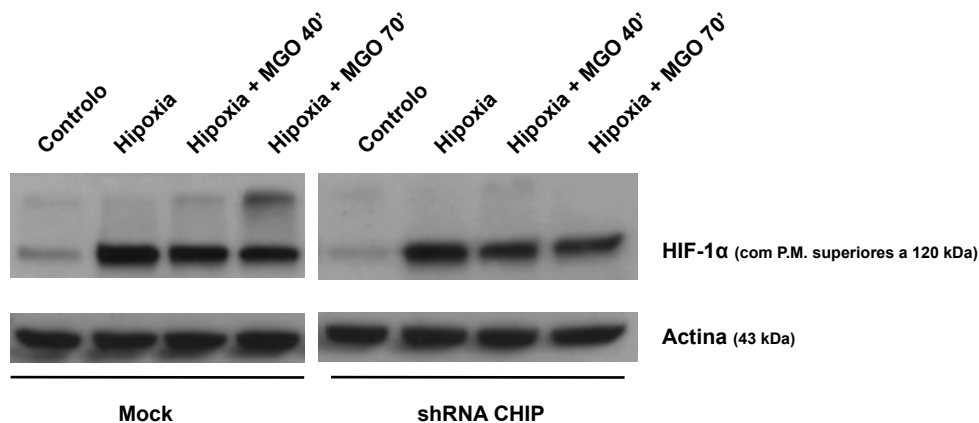
**Figura 2. Níveis elevados de MGO diminuem a acumulação nuclear de HIF-1 $\alpha$  em condições de hipoxia.** Células ARPE-19 foram sujeitas a hipoxia (2% O<sub>2</sub>) durante 6 horas e incubadas com MGO (3mM) nos últimos 90 minutos do tratamento. A distribuição celular do HIF-1 $\alpha$  foi avaliada por imunocitoquímica e microscopia de fluorescência (400x de ampliação).

De acordo com o que foi descrito recentemente pelo nosso grupo (Bento et al. 2010a), a CHIP (uma ligase de ubiquitina envolvida em processos de controlo de qualidade proteica) parece estar associada à degradação do HIF-1 $\alpha$  na presença de MGO. De forma a avaliar a possível função da CHIP neste mecanismo, foram usados shRNAs (*short-hairpin RNAs*) específicos contra o mRNA da CHIP, de forma a poder silenciar a sua expressão nas células (Figura 3). Através dos resultados apresentados nas Figuras 4 e 5 é possível constatar que o silenciamento da CHIP em células ARPE-19 diminui a acumulação de bandas de alto peso molecular que apresentam reactividade para anticorpos específicos contra o HIF-1 $\alpha$  (Figura 4) e que estabiliza parcialmente os níveis da proteína (Figura 5) em condições de hipoxia. Estes resultados sugerem que a CHIP poderá ter, de facto, uma função no processo de ubiquitinação e destabilização do HIF-1 $\alpha$  na presença de MGO. De forma a confirmar esses resultados, células que não expressam VHL, e que por conseguinte expressam HIF-1 $\alpha$  de

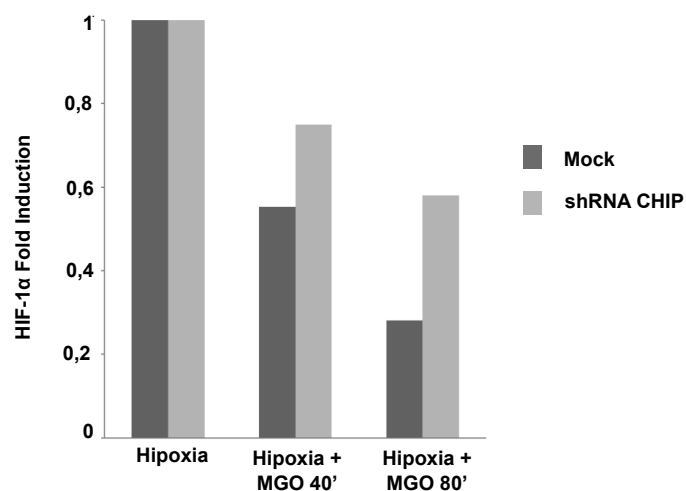
forma constitutiva, foram infectadas com adenovírus que codificam shRNAs contra a CHIP. Verificou-se que o silenciamento da CHIP diminui a acumulação de bandas de alto peso molecular que apresentam reactividade para anticorpos específicos contra o HIF-1 $\alpha$ , na presença de MGO, sugerindo uma diminuição dos níveis de ubiquitinação do HIF-1 $\alpha$  nessas condições (painel da esquerda da Figura 6). Os resultados da imunoprecipitação da Figura 6 mostram ainda que o silenciamento da CHIP estabiliza os níveis de HIF-1 $\alpha$  e diminui os níveis de ubiquitinação da proteína na presença de MGO (painel da direita da Figura 6), reforçando a ideia de que a CHIP desempenha uma função crucial na degradação do HIF-1 $\alpha$  na presença de MGO.



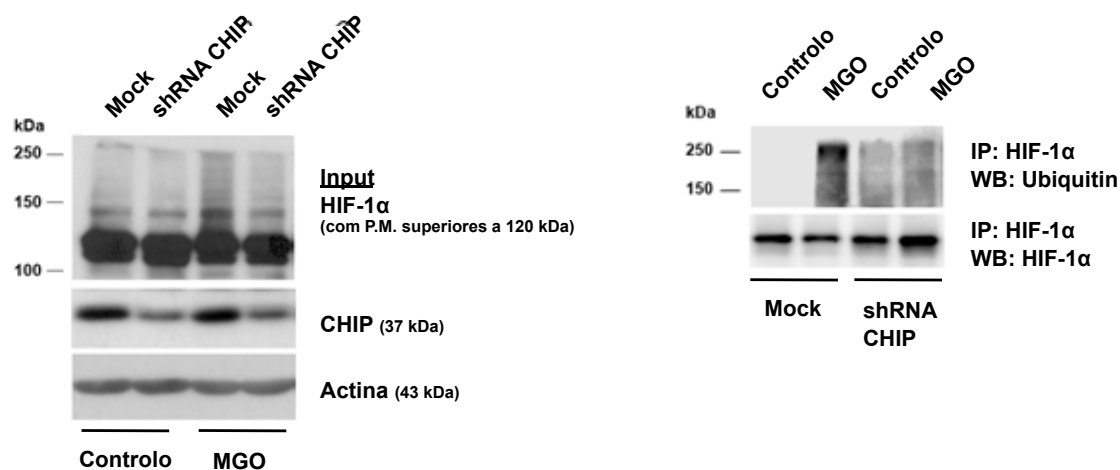
**Figura 3. Eficiência de silenciamento da CHIP usando um *shRNA* específico contra o mRNA da CHIP de humano.** Células ARPE-19 foram infectadas com o vector adenoviral pAD shRNA-hCHIP durante 48 horas. De seguida, as células foram lisadas e os extractos totais foram analisados por western blot usando anticorpos específicos contra a CHIP e a actina. O gráfico representa a quantificação do western blot contra a CHIP após normalização dos níveis para a actina (*loading control*).



**Figura 4. O silenciamento da CHIP diminui a acumulação de bandas de alto peso molecular que reagem com anticorpos específicos contra o HIF-1 $\alpha$  na presença de MGO.** Células ARPE-19 foram infectadas com o vector adenoviral pAD shRNA-hCHIP durante 48 horas. Posteriormente, as células foram sujeitas a hipoxia (2% O<sub>2</sub>) durante 6 horas e tratadas com MGO (3 mM), nos últimos 40 ou 70 minutos do período de incubação. Os lisados celulares foram analisados por western blot usando anticorpos específicos contra o HIF-1 $\alpha$  e a actina; P.M. – pesos moleculares.



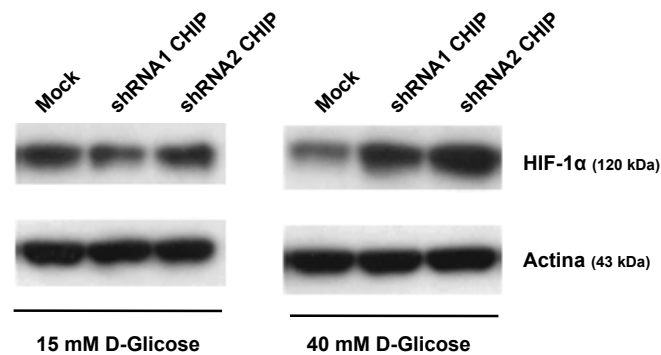
**Figura 5. O silenciamento da CHIP estabiliza o HIF-1 $\alpha$  na presença de MGO em condições de hipoxia.** Células ARPE-19 foram infectadas com pAd shRNA-hCHIP durante 48 horas. Durante as últimas 6 horas de incubação, as células foram sujeitas a hipoxia e tratadas com MGO (3 mM) durante os últimos 40 ou 70 minutos do período de incubação. Os lisados celulares foram analisados por western blot usando anticorpos específicos contra o HIF-1 $\alpha$  e a actina. O gráfico representa a quantificação do western blot contra o HIF-1 $\alpha$ , após normalização dos níveis para a actina (*loading control*), da figura 4.



**Figura 6. O silenciamento da CHIP induz estabilização do HIF-1 $\alpha$  e diminuição da sua ubiquitinação na presença de MGO em células que não expressam VHL.** Células RCC4 VHL $^{-/-}$ , infectadas com o vector viral pAd shRNA-hCHIP durante 48 horas, foram tratadas com MGO (3 mM) durante 70 minutos. Os lisados celulares foram usados para imunoprecipitar o HIF-1 $\alpha$  e os imunoprecipitados foram analisados por western blot usando anticorpos específicos contra o HIF-1 $\alpha$  e a ubiquitina (P4D1); P.M. – pesos moleculares.

Sabe-se que o MGO é produzido sobretudo como um produto secundário da glicólise e, por conseguinte, níveis elevados de glicose aumentam a produção e acumulação de MGO nas células, devido ao aumento do fluxo e actividade da via glicolítica. Deste modo, e de acordo com a informação descrita na literatura, é de esperar que níveis elevados de glicose levem a uma destabilização dos níveis de HIF-1 $\alpha$  em condições de hipoxia, devido a um aumento da produção de MGO. De facto, os resultados da Figura 7 mostram que concentrações elevadas de glicose (40 mM vs 15 mM D-glicose) diminuem os níveis de HIF-1 $\alpha$  em condições de hipoxia (por comparação da linha 1 e 4) em células ARPE-19. Verifica-se, ainda, que o silenciamento da CHIP (usando 2 *shRNAs* diferentes) induz estabilização do HIF-1 $\alpha$  na presença de alta glicose em condições de hipoxia, sugerindo que a CHIP tem uma função importante no processo de degradação e destabilização do HIF-1 $\alpha$  na presença de alta glicose. Deste modo, sugere-se com este trabalho que a CHIP poderá desempenhar um papel crucial

na perda de resposta celular à hipoxia na diabetes, através da degradação do HIF-1 $\alpha$  induzida por níveis elevados de glicose ou MGO.



**Figura 7. O silenciamento da CHIP induz estabilização do HIF-1 $\alpha$  na presença de glicose e em condições de hipoxia.** Células ARPE-19 foram incubadas com 15 mM ou 40 mM de D-glicose durante 10 dias. Após 8 dias de incubação, as células foram infectadas com o vector adenoviral pAd shRNA-hCHIP durante 48 horas. Durante as últimas 6 horas de incubação, as células foram sujeitas a hipoxia (2% O<sub>2</sub>) e posteriormente lisadas. Os lisados foram analisados por western blot usando anticorpos específicos contra o HIF-1 $\alpha$  e a actina.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem não só compreender melhor os mecanismos moleculares associados à perda de resposta celular à hipoxia em condições caracterizadas por níveis elevados de glicose ou MGO, como também antecipar um possível novo alvo terapêutico no tratamento de complicações que derivam de uma perda de resposta celular a níveis reduzidos de oxigénio, como por exemplo na diabetes.

Este trabalho mostra que a exposição das células a níveis elevados de MGO ou glicose induz degradação do HIF-1 $\alpha$  em condições de hipoxia. Verificou-se, ainda, que essa degradação é independente de oxigénio e da ligase de ubiquitina canonicamente associada à degradação do HIF-1 $\alpha$ , a VHL. Os resultados sugerem, à semelhança de outros estudos publicados (Bento et al. 2010a), que a degradação do HIF-1 $\alpha$  em condições caracterizadas por níveis elevados de glicose ou MGO depende da ligase de ubiquitina CHIP. De facto, mostra-se que o silenciamento da CHIP estabiliza o HIF-1 $\alpha$  nessas condições, em células de carcinoma renal RCC4 VHL<sup>-/-</sup> e em células do epitélio pigmentado da retina.

Os resultados mostram, ainda, que a incubação das células com MGO leva a uma diminuição dos níveis nucleares de HIF-1 $\alpha$ , em situações de hipoxia, e a uma diminuição da expressão de VEGF-A, um gene alvo do factor de transcrição HIF-1. Estes resultados sugerem uma diminuição da actividade de transcrição do HIF-1 e uma maior susceptibilidade celular a condições de hipoxia. Além disso, é importante evidenciar o facto de que a diminuição de expressão de VEGF-A, associada a um aumento da destabilização do HIF-1 $\alpha$ , pode explicar a regressão vascular, disfunção endotelial e inibição do processo angiogénico que caracterizam muitas das complicações microvasculares da diabetes (Ceradini et al. 2008; Liu et al. 2008; Botusan et al. 2008; Sarkar et al. 2009; Thangarajah et al. 2009; Bento et al. 2010a).

Alguns dos muitos trabalhos que estudam a diminuição de expressão de VEGF em tecidos diabéticos sugerem um mecanismo molecular paralelo ao proposto neste trabalho, que assenta igualmente na desregulação da via do HIF-1 induzida pelo MGO (Ceradini et al. 2008; Thangarajah et al. 2009). No entanto, esses trabalhos sugerem que o aumento dos níveis de MGO, em condições de hiperglicemia, induz modificações do HIF-1 $\alpha$  (Ceradini et al. 2008) e do co-activador p300 do factor de transcrição HIF-1 (Thangarajah et al. 2009), inibindo as interações HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  e HIF-1 $\alpha$ /p300. A inibição dessas interações parece conduzir à diminuição da actividade de transcrição do HIF-1 e à consequente perda de resposta celular à hipoxia. Embora esta e outras alterações induzidas pelo MGO não possam ser excluídas, o nosso trabalho mostra um mecanismo molecular independente para a destabilização do HIF-1 $\alpha$ , pelo qual o MGO parece conduzir à degradação do HIF-1 $\alpha$  pela via da ubiquitina-proteossoma, mediada pela CHIP. É importante sublinhar que ambas as observações não são inconsistentes. De facto, é plausível que a diminuição da interacção entre HIF-1 $\alpha$ /p300 e HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$ , na presença de MGO, aumente a quantidade de HIF-1 $\alpha$  modificado e não-funcional nas células, ficando assim disponível para degradação através de uma via mediada pela CHIP, uma ligase de ubiquitina canonicamente associada à degradação de proteínas lesadas e/ou modificadas.

Em concordância com os nossos resultados, foi demonstrado, anteriormente, que a modificação do HIF-1 $\alpha$  pelo MGO leva ao aumento da sua interacção com os chaperones moleculares Hsp40 e Hsp70, recrutando a CHIP que encaminha o HIF-1 $\alpha$  para degradação no proteossoma (Bento et al. 2010a). De acordo com esse trabalho, pensa-se que as modificações induzidas pelo MGO tendem a expor regiões hidrofóbicas do HIF-1 $\alpha$ , que passam a ser reconhecidas por chaperones moleculares, que funcionam de forma a prevenir a agregação irreversível da proteína, através da estabilização da sua conformação nativa. Contudo, essa função parece estar comprometida em condições caracterizadas por níveis elevados de MGO,

conduzindo a uma falha de “reparação”. Nessa situação, um mecanismo alternativo que envolve o recrutamento da CHIP pelos chaperones moleculares Hsp40 e Hsp70 parece ser activado, conduzindo à poliubiquitinação do HIF-1 $\alpha$  e a sua subsequente degradação pelo proteossoma. Esta função da CHIP e de chaperones moleculares, no controlo de qualidade proteica, está de acordo com outros trabalhos publicados anteriormente (Ballinger et al. 1999; Xu et al. 2002; Murata et al. 2001) e não é difícil de antecipar em condições que induzem acumulação de proteínas modificadas e/ou lesadas, como por exemplo em condições caracterizadas por níveis elevados de MGO.

Dado que o MGO induz modificação de inúmeras proteínas celulares, este trabalho sugere que o mecanismo de degradação proposto pode ser aplicado a outros alvos proteicos. De acordo com essa hipótese, foi, por exemplo, demonstrado anteriormente que a proteína Raf-1 é degradada por um mecanismo dependente da via da ubiquitina-proteossoma em resposta ao MGO (Du et al. 2006). Além disso, aductos do tipo CML (N- $\epsilon$ -carboximetil-lisina), derivados da modificação de proteínas pelo glioxal (GO), parecem ser substratos para a conjugação de ubiquitina, sugerindo um mecanismo pelo qual proteínas modificados por MGO ou GO podem ser encaminhadas para degradação (Bulteau et al. 2001). Estas observações levantam a hipótese de que a via da ubiquitina-proteossoma pode estar envolvida na degradação de proteínas modificadas pelo MGO e, presumivelmente, por outros produtos de glicação, cujos níveis estão aumentados na diabetes. No entanto, é prudente não considerar que o mecanismo proposto é generalizado a todos os alvos proteicos. Por exemplo, foi demonstrado que o MGO diminui a fosforilação da STAT3 e diminui a sua actividade de transcrição (Lee et al. 2009). Foi também demonstrado que o MGO inibe a ligação NF- $\kappa$ B/DNA conduzindo a uma diminuição da expressão de TNF- $\alpha$ , um gene alvo do NF- $\kappa$ B (Laga et al. 2007). De acordo com o descrito nesses trabalhos, o MGO não induz degradação dos factores de transcrição STAT3 e NF- $\kappa$ B, o que sugere que o mecanismo de degradação de alvos proteicos



modificados pelo MGO, dependente da via da ubiquitina-proteossoma, e, presumivelmente, da CHIP, não é de natureza ubíqua.

Apesar dos resultados obtidos permitirem compreender melhor a perda de resposta celular à hipoxia na diabetes e de abrirem novas perspectivas de terapêutica, é importante prosseguir com os estudos nesta área de trabalho. O silenciamento da CHIP ou a sobreexpressão de glioxalase I, a enzima limitante no processo de destoxificação de MGO nas células, parecem estratégias promissoras no tratamento ou prevenção das complicações da diabetes que advêm de uma perda de resposta celular a níveis reduzidos de oxigénio. Essas estratégias, conjuntamente com uma melhor compreensão do mecanismo molecular subjacente à destabilização do HIF-1 $\alpha$  na diabetes, irão permitir novos avanços na área e, eventualmente, desenhar estratégias terapêuticas de base genética que impeçam a morte celular e regressão vascular associada à perda de resposta celular à hipoxia na diabetes.

Em suma, este trabalho é de elevada importância para o actual estado do conhecimento da área em estudo, não só porque sugere um novo mecanismo molecular de degradação do HIF-1 $\alpha$ , independente de oxigénio e da ligase de ubiquitina VHL, e que envolve a CHIP, como também porque esclarece os possíveis mecanismos celulares e moleculares que estão na base da perda de resposta celular à hipoxia na diabetes e antecipa possíveis novos alvos terapêuticos no tratamento de complicações que daí advêm.

## REFERÊNCIAS

Abaci A, Oguzhan A, Kahraman S, et al. (1999) Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation* 99: 2239-2242.

Ballinger CA, Connell P, Wu Y, Hu Z, Thompson LJ, et al. (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* 19: 4535-4545.

Bento CF, Fernandes R, Ramalho J, et al. (2010a) The Chaperone-Dependent Ubiquitin Ligase CHIP Targets HIF-1alpha for Degradation in the Presence of Methylglyoxal. *PLoS One* 5: e15062.

Bento CF, Fernandes R, Matafome P, Sena C, Seica R, Pereira P (2010b) Methylglyoxal-induced imbalance in the ratio of vascular endothelial growth factor to angiopoietin 2 secreted by retinal pigment epithelial cells leads to endothelial dysfunction. *Exp Physiol* 95: 955-970.

Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, et al. (2008) Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19426-19431.

Bulteau AL, Verbeke P, Petropoulos I, Chaffotte AF, Friguet B (2001) Proteasome inhibition in glyoxal-treated fibroblasts and resistance of glycated glucose-6-phosphate dehydrogenase to 20 S proteasome degradation in vitro. *J Biol Chem* 276: 45662-45668.

Catrina SB, Okamoto K, Pereira T, Brismar K, Poellinger L (2004) Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1alpha protein stability and function. *Diabetes* 53: 3226-3232.

Ceradini DJ, Yao D, Grogan RH, et al. (2008) Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *J Biol Chem* 283: 10930-10938.

Du J, Zeng J, Ou X, Ren X, Cai S (2006) Methylglyoxal downregulates Raf-1 protein through a ubiquitination-mediated mechanism. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1084-1091.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43-54.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16: 4604-4613.

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7987-7992.

Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. (2001) HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292: 464-468.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472.

Kalapos MP (1999) Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett* 110: 145-175.

Kimura H, Weisz A, Ogura T, 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.

Laga M, Cottyn A, Van Herreweghe F, Vanden Berghe W, Haegeman G, et al. (2007) Methylglyoxal suppresses TNF-alpha-induced NF-kappaB activation by inhibiting NF-kappaB DNA-binding. *Biochem Pharmacol* 74: 579-589.

Lee HK, Seo IA, Suh DJ, Lee HJ, Park HT (2009) A novel mechanism of methylglyoxal cytotoxicity in neuroglial cells. *J Neurochem* 108: 273-284.

Liu L, Marti GP, Wei X, et al. (2008) Age-dependent impairment of HIF-1alpha expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells. *J Cell Physiol* 217: 319-327.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399: 271-275.

Murata S, Minami Y, Minami M, Chiba T, Tanaka K (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* 2: 1133-1138.

Portero-Otin M, Pamplona R, Bellmunt MJ, Ruiz MC, Prat J, et al. (2002) Advanced glycation end product precursors impair epidermal growth factor receptor signaling. *Diabetes* 51: 1535-1542.

Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM (2006) Methylglyoxal comes of AGE. *Cell* 124: 258-260.

Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272: 22642-22647.

Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS. (2004) Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem*. 279: 40337-40344.

Sarkar K, Fox-Talbot K, Steenbergen C, Bosch-Marce M, Semenza GL (2009) Adenoviral transfer of HIF-1alpha enhances vascular responses to critical limb ischemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18769-18774.

Schofield CJ, Ratcliffe PJ. (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*. 338: 617-626.

Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5680-5684

Stitt AW, McGoldrick C, Rice-McCaldin A, McCance DR, Glenn JV, et al. (2005) Impaired retinal angiogenesis in diabetes: role of advanced glycation end products and galectin-3. *Diabetes* 54: 785-794.

Thangarajah H, Yao D, Chang EI, et al. (2009) The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*

Xu W, Marcu M, Yuan X, Mimnaugh E, Patterson C, et al. (2002) Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12847-12852.

Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. (2003) Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem.* 278: 15911-15916.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, queria agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Paulo Pereira, por me ter aceite neste projecto, concedendo-me, assim, a oportunidade de conhecer mais aprofundadamente o trabalho laboratorial e realizar a minha Tese de Mestrado. Agradeço toda a disponibilidade, sabedoria e simpatia com que sempre me recebeu. Foi um privilégio ter sido sua orientanda.

À Doutora Carla Bento um agradecimento muito especial por toda a paciência que teve para comigo. Por todos os trabalhos que realizámos em conjunto, pelos ensinamentos constantes, por toda a ajuda prestada, pela incansável dedicação e pela amizade construída ao longo deste projecto, o meu mais sincero agradecimento.

À Doutora Rosa Fernandes e à Dr.<sup>a</sup> Filipa Marques agradeço a sua preciosa colaboração, por todos os esclarecimentos prestados e por se terem mostrado sempre disponíveis em todos os momentos.

Ao meu irmão, pelo apoio incondicional, por teres sido sempre o meu suporte nos momentos mais difíceis e em que tudo deixa de parecer possível. Obrigado por existires e me obrigares a existir.

Ao meu pai, por teres feito de mim a pessoa que sou hoje. Por todo o orgulho e amor que sempre tiveste por mim, e que eu sempre percebia só pelo teu olhar. Espero que continues a olhar por mim e espero nunca, nunca, te decepcionar.

E por fim à minha mãe, porque sem ela nunca teria sido possível a efectivação deste trabalho. Obrigado por me teres feito viver sempre rodeada de muito afecto e por estares sempre presente, mesmo nas vezes, sem conta, que eu não pude estar perto de ti.