

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Laboratório de Biologia Molecular

**“Clonagem e Expressão do Fator 1 Humano Induzível
por Hipóxia (HIF-1) na Levedura *Saccharomyces
cerevisiae*”.**

TÚLIO CÉSAR FERREIRA

Orientadora: Prof^a. Dra. Élide Geralda Campos (UnB)

Co-orientadores: Prof^a. Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes (UnB)

Prof. Dr. Max Gassmann (Universidade de Zurique)

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia Molecular
como cumprimento parcial dos requerimentos
para obtenção do título de Doutor em Biologia
Molecular.**

**Brasília-DF.
Outubro, 2006**

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Membros Titulares

Dr. Roberto Magalhães Saraiva – Inst. Nacional de Cardiologia de Laranjeira/RJ

Dra. Marlinda Lobo de Souza – Embrapa-Cenargen

Dr. Francisco de Assiz Rocha Neves – UnB

Dra. Vera Lúcia Perussi Pomez – UnB

Membro Suplente

Dra. Yolanda Galindo Pacheco – UnB

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular - Departamento de Biologia Celular - Instituto de Biologia. Universidade de Brasília.

*Wenn du es am wenigsten erwartest,.... schließlich
und endlich fügt sich doch alles zum Guten
(Quando você menos imagina,... as coisas sempre acabam se resolvendo)*

Aos meus queridos pais e irmãos, que compartilharam os meus ideais e os alimentaram, me incentivando a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos, a vocês que mesmo distantes se mantiveram sempre ao meu lado, lutando comigo, dedico esta minha conquista com a mais profunda admiração e respeito.

Agradeço à minha orientadora Professora Dra. Élide Campos, pela paciência, compreensão, motivação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por acreditar em mim e ter me dado a oportunidade de crescer.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Max Gassmann por ter me recebido de braços abertos em seu grupo de pesquisa e por todo o apoio, atenção e amizade.

*Agradeço a Professora Lídia Pepe de Moraes pela sua
colaboração e pelo seu apoio durante o desenvolvimento do
meu trabalho.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Não só aos que estiveram diretamente ligados ao desenvolvimento do meu projeto, mas aos que também demonstraram os vários gestos de carinho e amizade.

Agradeço:

A Deus.

Agradeço profundamente a minha mãe Maria Aparecida e meu pai Hener pelo amor, afeto e carinho que me deram durante todos os dias de minha vida. Mesmo não participando diariamente de minha vida acadêmica sempre me deram palavras de conforto nos momentos mais difíceis.

Os meus queridos irmãos Jane, Júnior, Giane, Helder, Helber e Dayane pelo carinho, atenção e companheirismo. Amo vocês.

Os meus sobrinhos Thaís e Gabriel pela alegria que me deram.

Os meus cunhados Roseli e Guilherme.

A tia Sônia, uma pessoa mais que especial não só para mim como também para a minha família. Sinto-me a vontade em dizer que de certa forma você é a nossa segunda mãe.

O tio Adilson por sua bondade e companheirismo.

As minhas tias que amo muito Hester, Helma, Helen e Hélia. Vocês são nota 10. Obrigado por todo e qualquer apoio que me deram. Ao grandioso tio Helinho, uma pessoa que eu admiro e respeito muito.

Os tios Hélice Heleno e Heli Marcos. Obrigado por todo apoio.

Os meus primos, Grazielle, Lorena, Sidney, Meirielen, Nara e Hermano. Amo vocês demais. Eu os considero como meus irmãos e irmãs.

Os meus queridos primos Gaspar e Felipe. Obrigado pela amizade e pelo carinho. Vocês são muito engraçados.

Os meus primos Júnior, Luciana, Adriana, Raquel e Juliana.

Os meus grandes amigos Antônio Américo, Livônios, Alexssandro, Luciano, André Nicola, Aldo, Saulo, Rafael, Pedro, Basti, Marciano, Leandro e Gustavo. Obrigado pela amizade.

As minhas grandes amigas Paty Girl e Alê que começaram agora suas jornadas no doutorado nos EUA e Inglaterra, respectivamente. Valeu. Espero que nós nos vejamos o mais breve possível.

A minha amigona Viviane. Obrigado por ser muito especial.

A amiga, Rosângela (grande Rose). Obrigado pelo seu companheirismo desde os tempos de graduação. Tivemos muitos momentos bons e engraçados.

A Indra e Nádia que também deram um grande passo em suas carreiras. Desejo-lhes sucesso ai nos EUA e Suécia.

A Paty Vet, obrigado pelo companheirismo e pelas conversas para tentar me acalmar.

Os amigos Tiago, David, Cristiano e Karla. Grandes companheiros do laboratório 0.

Os meus demais amigos, Hernandez, Mauro, Thiago, Bruno Beloniel, Chrisinha, Maria José, Camila, Flávia, Larissa, Alice, Vera, Loise, Simoneide, Lorena, Marcus, Isabela, Janice, Mariana e Karen.

Aos meus amigos de Zurique, Hans-Hermann, Benjamin Lustig, Florian, Marc Vinzenz, os quais me integraram no círculo de amizade. Vocês tiveram grande importância na minha estadia em Zurique.

Aos meus colegas de laboratório Jorge (meu grande e super divertido amigo), Beat Schuler, Vinzenz, Patrick, Karin, Katrin (quem sempre me chamava para os eventos sociais fora do ambiente de trabalho), Nicole, Xenia, Beat, Ilmar, Abraham e Micola.

Obrigado Lara e Thomas Gorr pelos bons conselhos. A Anna e Johannas pelo auxílio.

A Bianca e Stephan Keller pela grande ajuda. Graças a vocês consegui resolver vários problemas burocráticos para o início dos meus trabalhos na Universidade de Zurique e também por me ajudarem a me adaptar no novo ambiente de trabalho.

A Annamaria Manini que foi uma pessoa muito especial e uma grande companheira.

A Frau Steiner, uma pessoa muito especial em minha vida. Agradeço os momentos alegres que tivemos na Weinbergstrasse 20, durante minha estadia em Zurique. Graças a essa simpática velhinha me senti em casa. Não é para menos que eu a “adotei” como minha avó suíça.

O Dr. Von Matt por sua atenção por ter me alugado o quarto em Zurique e a Ivica Kivietikova por sua amizade e companheirismo.

A Maria Alice, grande brasileira que conheci na Suíça. Valeu pelo companheirismo e pelas dicas.

Os professores Lídia, Marcelo, Marcos, Ildinete, Fernando, Sueli, Andréa e Márcio Poças que de alguma forma também contribuíram para o meu crescimento como pesquisador.

O Professor Max, por todo apoio, inclusive financeiro. Você foi muito gentil e prestativo por financiar meu aluguel e três meses de salário durante a minha estadia em Zurique. Com isso, pude ter uma qualidade de vida melhor.

O Professor Francisco Neves, por me permitir trabalhar em seu laboratório.

As técnicas do nosso laboratório, Fátima e Ivonildes que mantêm o laboratório sempre organizado. A dona Conceição por manter nosso laboratório limpo.

A Ana (secretária do departamento), por ser bastante prestativa e estar sempre ao dispor. A secretária Sandra por sua assistência.

As secretárias do Instituto de Fisiologia Veterinária, Gabriela e Brigitte por resolver todos os trâmites necessários para a minha estadia em Zurique.

A Dra. Veronique-Della Valle (França) por me fornecer o anticorpo anti-ARNT.

O Mauro Xavier por ter me fornecido alguns dos vetores de expressão em leveduras.

Enfim, agradeço a todos aqueles que por algum motivo não os tenha mencionado.

Muito Obrigado, de coração!

PREFÁCIO

Organização da tese

O texto desta tese está organizado em:

- I. Introdução, contendo revisão da literatura de tópicos inerentes ao tema estudado**
- II. Objetivos Gerais**
- III. Objetivos Específicos**
- IV. Materiais**
- V. Métodos**
- VI. Resultados**
- VII. Discussão**
- VIII. Conclusões Gerais**
- IX. Perspectivas**
- X. Referências bibliográficas**

Anexo: Artigo aceito para publicação na Revista *Comparative Biochemistry and Physiology/CBP-LatAm*, parte C.

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

Lista de Figuras-----i

Lista de Tabelas-----iii

Lista de Abreviaturas-----v

Resumo -----ix

Abstract -----xi

I. Introdução

1. Hipóxia e Fator Induzível por Hipóxia-1 (HIF-1) ----- 1

2. Estrutura do HIF-1 -----2

3. Coativadores do HIF-1 -----5

4. Regulação do HIF-1 -----6

4.1. Fosforilação -----6

4.2. Hidroxilação -----9

4.3. Acetilação e Nitrosilação -----	12
5. As isoformas do HIF -----	13
6. Genes alvos do HIF-1 -----	16
7. Envolvimento do HIF-1 na apoptose e resposta adaptativa -----	21
8. Estresse oxidativo -----	24
8.1. Papel do estresse oxidativo na regulação do HIF-1-----	26
8.2. EROs como moléculas sinalizadoras-----	27
9. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	29
10. Contextura dos tópicos do trabalho -----	33
II. Objetivo Geral -----	35
III. Objetivos Específicos -----	35
IV. Material	
1. Linhagens de leveduras -----	36
2. Linhagens bacterianas -----	36
3. Meios de cultura -----	37

4.	Tampões de reação -----	38
5.	Antibióticos -----	39
6.	Aminoácidos e suplementos -----	40
7.	Soluções -----	40
8.	Anticorpos -----	45
9.	Enzimas de Restrição -----	47
10.	Outras enzimas -----	47
11.	Marcadores de massa molecular -----	48
12.	Vetores -----	49
13.	Oligonucleotídeos -----	51

V. Métodos

1.	Obtenção dos genes completos das subunidades do HIF-1 por reação em cadeia da polimerase (PCR) -----	52
2.	Obtenção da versão truncada do ARNT por PCR -----	52
3.	Sistema de ligação -----	53

4.	Preparação de células eletrocompetentes -----	53
5.	Preparação de células termocompetentes -----	54
6.	Transformação por eletroporação -----	55
7.	Extração de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep) -----	55
8.	Sequenciamento -----	56
9.	Digestão com <i>BamHI</i> para liberação das subunidades do HIF-1 -----	57
10.	Eluição de DNA de gel de agarose -----	57
11.	Transformação por choque térmico -----	58
12.	Digestão dos vetores de expressão em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	59
12.1.	Vetores Y1PGK e Y1GAL -----	59
12.2.	Vetor Y2PGK -----	59
12.3.	Vetor pYPGE2 -----	60
13.	Defosforilação dos vetores linearizados -----	60
14.	Sistemas de ligação -----	61
15.	Transformação em células de leveduras -----	61
16.	Condições de crescimento -----	63

17. Curva de crescimento -----	63
18. Cultura de células de mamíferos e condições de crescimento -----	64
19. Extração de proteínas nucleares de células HeLa -----	64
20. Preparação de extratos protéicos de leveduras (Para ensaios de Western Blot e EMSA) -----	65
21. Determinação da concentração de proteína -----	65
22. Teste de mudança da mobilidade eletroforética (EMSA) -----	65
23. Western Blot -----	66
24. Pesquisa pelo motivo HRE humano no genoma de levedura -----	67
25. Validação dos dados -----	68
26. Análise dos resultados -----	69

VI. Resultados

1. Amplificação dos genes HIF-1 α e ARNT por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) -----	70
2. Subclonagem dos genes das subunidades do HIF-1 em vetores de expressão de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	75
3. Transformação de leveduras -----	84

4.	Western blotting para a subunidade HIF-1 α -----	84
5.	Western blotting para a subunidade ARNT -----	88
6.	Obtenção da versão truncada do gene que codifica para o ARNT -----	89
7.	EMSA (Eletrophoretic Mobility Shift Assay) -----	94
8.	Curva de crescimento -----	97
9.	Detecção da ligação de proteínas endógenas de leveduras ao DNA -----	99
10.	<i>Clusters</i> de HRE no genoma da levedura <i>S. cerevisiae</i> -----	101
11.	Validação estatística dos resultados obtidos com o programa RSAT -----	101
12.	Classificação dos genes de leveduras que possuem HRE -----	105
13.	Motivos LORE no genoma da levedura <i>S. cerevisiae</i> -----	107
VII. Discussão -----		108
1.	<i>S. cerevisiae</i> como um modelo de estudo -----	108
2.	Presença de HRE em potencial no genoma de <i>S. cerevisiae</i> -----	111
VIII. Conclusões Gerais -----		116

IX. Perspectivas -----118

X. Bibliografía -----120

ANEXO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos processos fisiológicos e patológicos nos quais o HIF-1 tem uma função como regulador central -----	2
Figura 2. Representação esquemática das proteínas que constituem as duas subunidades do HIF-1 humano -----	4
Figura 3. Esquema das duas principais vias de fosforilação do HIF-1 α -----	8
Figura 4. Representação esquemática do mecanismo de regulação da expressão gênica do fator 1 induzível por hipóxia α (HIF-1 α) -----	11
Figura 5. Isoformas da subunidade α do HIF-1 humano -----	14
Figura 6. Representação esquemática dos efeitos pro- e anti-apoptóticos do HIF-1 --- -----	24
Figura 7. Mapas físicos dos plasmídeos pBSKhHIF1- α e pBShARNTKS ⁺ -----	49
Figura 8. Mapas físicos dos plasmídeos Y1PGK e Y1GAL -----	49
Figura 9. Mapa físico do plasmídeo Y2PGK -----	50
Figura 10. Mapas físicos dos plasmídeos pYPGE2 e Y2ARNT -----	50
Figura 11. Amplificação dos genes HIF-1 α e ARNT por reação em cadeia da polimerase (PCR) -----	70
Figura 12. Seqüências de nucleotídeos (letras minúsculas) e aminoácidos (letras maiúsculas) do gene que codifica a subunidade α do HIF-1 (<i>hif-1α</i>) -----	71

Figura 13. Seqüências de nucleotídeos (letras minúsculas) e aminoácidos (letras maiúsculas) do gene da subunidade β do HIF-1 (<i>arnt</i>) -----	73
Figura 14. Representação esquemática das estratégias utilizadas para as construções dos vetores Y1PGK α e Y1PGK β -----	76
Figura 15. Representação esquemática das estratégias utilizadas para as construções dos vetores Y1GAL α e Y1GAL β -----	77
Figura 16: Esquema ilustrando os sistemas de digestão para identificação dos vetores contendo os genes do HIF-1 nas orientações corretas -----	78
Figura 17: Esquema ilustrando os sistemas de digestão para identificação dos vetores contendo os genes do HIF-1 nas orientações corretas -----	79
Figura 18. Análise de restrição dos cassetes de expressão Y1PGK α e Y1PGK β ----- -----	80
Figura 19. Análise de restrição dos cassetes de expressão Y1GAL α e Y1GAL β ----- -----	80
Figura 20. Representação esquemática das estratégias utilizadas para as construção do vetor Y2PGK β -----	82
Figura 21. Western blot para detecção do HIF-1 α -----	85
Figura 22. Western blot para detecção do HIF-1 α em condições de normóxia e hipóxia-----	86
Figura 23. Western blot para destecção do ARNT nas linhagens transformadas somente com o vetor Y1PGK β -----	88
Figura 24. Western blot para destecção do ARNT na linhagem EG103 α transformada com o vetor pY2ARNT-----	89

Figura 25. Amplificação do gene <i>hif-1β</i> (ARNT) para obtenção de sua versão truncada -----	90
Figura 26. Representação esquemática das estratégias utilizadas para as construções do vetore pYtARNT -----	92
Figura 27: Esquema ilustrando o sistema de digestão para identificação do vetor contendo a versão truncado do gene <i>arnt</i> na orientação correta -----	93
Figura 28. Análise de restrição do cassete de expressão pYtARNT -----	93
Figura 29. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) foi feito usando a sonda EPO marcada radioativamente em gel de poliacrilamida 5% nativo -----	96
Figura 30. Curva de crescimento das culturas de leveduras -----	98
Figura 31. Teste de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) -----	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos genes alvos do HIF-1 de diversas espécies -----	16
Tabela 2. Proteínas que interagem com o HIF-1 α -----	19
Tabela 3. Estímulos que induzem a expressão do HIF-1 α , sua ativação ou ambas independente da hipóxia -----	27
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados no estudo -----	51
Tabela 5. Vetores obtidos após subclonagem das subunidades do HIF-1 nos vetores de expressão de <i>S. cerevisiae</i> -----	62

Tabela 6. Vetores obtidos após subclonagem das subunidades do HIF-1 nos vetores de expressão de *S. cerevisiae* -----83

Tabela 7. Vetor obtido após subclonagem da subunidade truncada do ARNT no vetor de expressão de *S. cerevisiae* -----91

Tabela 8. Linhagens de leveduras obtidas nesse trabalho -----94

Tabela 9. HRE putativos nas regiões regulatórias *upstream* dos genes de levedura --
-----102

Tabela 10. Genes de levedura que contêm *clusters* de HRE putativos listados de acordo com suas funções biológicas -----106

Tabela 11. Relação dos genes de levedura que possuem LORE putativos -----107

LISTA DE ABREVIATURAS

*OH:	Radical hidroxil
µg:	Microgramas
µL:	Microlitros
A:	Adenina
Ahr:	Receptor de aril hidrocarbono
ALS:	Esclerose lateral amiotrófica
ANP:	Peptídeo natriurético atrial
AP1:	Proteína 1 ativadora
ARD1:	Acetiltransferase chamada de <i>arrest-defective 1</i>
ARNT:	Transportador nuclear de aril hidrocarbono
ATP:	Adenosina Trifosfato
bHLH:	Domínio basico-hélice-loop-hélice
C:	Citosina
CAIX:	Anidrase carbônica IX
CAT:	Catalase
CBP:	Proteína ligante ao CREB.
CCP:	Citocromo c peroxidase
CoCl ₂ :	Cloreto de cobalto
CREB:	Proteína ligante ao elemento responsivo ao cAMP
CTE:	Cadeia transportadora de elétrons
CTGF:	Fator de crescimento do tecido conectivo
CYP2C11:	Gene membro da familia da citocromo P450
CYP3A6:	Gene membro da familia da citocromo P450
CYP4B1:	Gene membro da familia da citocromo P450
DNA:	Ácido desoxiribonucleotídeo
EMSA:	Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética
ENO:	Enolase
EPAS1:	Domínio PAS da proteína endotelial 1
EPO:	Eritropoietina
ERKs:	Quinases reguladas por sinais extracelulares
EROs:	Espécies reativas de oxigênio

FALS:	Esclerose lateral amiotrófica familiar
FIH:	Fator inibidor de HIF-1
Flt-1/VEGF-R1:	Receptor do VEGF
FRDA:	Ataxia de Friedreich
FS:	Seqüência flanqueadora
FSH:	Hormônio folículo estimulante
g:	Gravidade
G:	Guanina
GAL:	β -galactosidase
GAPDH:	Glicerladeído 3-fosfato-desidrogenase
GLUT-1:	Transportador de glicose - 1
GPX:	Glutaciona peroxidase
GRP94:	Proteína 94 regulada pela glicose
GSH:	Glutaciona reduzida
GSK-3:	glicogênio sintase quinase-3
h:	Hora
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogênio
HBS:	Sítio de ligação ao HIF-1
HDAC:	Histona deacetilase
HIF-1:	Fator induzível por hipóxia -1
HNF4:	Fator 4 nuclear de hepatócito
HPH:	Prolil hidroxilase do HIF
HRE:	Elemento responsivo a hipóxia
Hsp90:	Proteína de choque térmico 90
HUVECs:	Células do endotélio da veia umbilical humana
HXK1 e 2	Hexoquinases 1 e 2
ID:	Domínio inibitório do HIF-1 α
IGF1 e 2:	Fator 1/Fator 2 de crescimento de insulina
IGFBP-1:	Proteína 1 que se liga ao fator de crescimento semelhante à insulina
IPAS:	Proteína inibitória com domínio PAS
ITF:	Proteína da barreira intestinal
IVS:	Seqüência interveniente
JNKs:	c-Jun NH ₂ -terminal quinases

LORE:	Elemento responsivo a baixo oxigênio
MAPK:	Proteína quinase ativada
MDR1:	Proteína 1 multi-resistente a drogas
MEK:	Quinases ativadoras de MAP-ERK
mg:	Miligrama
MgCl ₂ :	Cloreto de magnésio
min:	Minuto
mL:	Mililitro
MT1:	Metaloproteinase da matriz
mTOR:	Proteína alvo de rapamicina de mamífero
NO:	Óxido nítrico
NIP3:	Proteína 3 imunogênica nova
O ₂ ^{•-} :	Radical superóxido
O ₂ :	Oxigênio
OD600:	Densidade ótica a 600 nanômetros
ODDD:	Domínio de degradação dependente de oxigênio
ORF:	Fase aberta de leitura
PAS:	domínio comum encontrado nos genes <i>per1</i> , <i>arnt</i> , <i>ahr</i> e <i>sim</i> .
PCR:	Reação em cadeia da polimerase
PEPCK:	Fosfoenolpiruvato carboxiquianase
PFK:	Fosfofrutoquinase
PFKFB3:	6-fosfofruto-2-quinase/ Frutose 2,6-bifosfatase
PGK:	Fosfoglicerato quinase
PHD:	Proteína com domínio de prolil hidroxilase
PI:	Fosfatidilinositol
PI3K:	Fosfatidilinositol-3 quinase
PP5:	Serine / threonine protein phosphatase 5
PSMA7:	Sububidade do proteassoma, tipo alfa, 7
PSSM:	Matriz de escore de uma posição específica (<i>Position specific score matrix</i>)
PWM:	Position weight matrix
Ref-1:	Fator redox 1
ROR α 4:	Receptor órfão relacionado ao RA
SDF-1:	Fator 1 derivado de células do estroma

SOD	Superóxido dismutase
T:	Timina
TAD-C:	Domínio de transativação – extremidade carboxi-terminal
TAD-N:	Domínio de transativação – extremidade NH ₂ -terminal
TDH2:	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
TGF-β3:	Fator de crescimento tumoral β3
TRX:	Tioredoxina
VEGF:	Fator de crescimento endotelial vascular
VHL:	Van Hippel Lindau

Resumo

O fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1) é um regulador central da resposta à mudanças na concentração de oxigênio e tem um papel importante nos processos fisiológicos e patológicos em humanos. Este fator de transcrição é expresso quando as células de mamíferos são submetidas às condições de hipóxia e ativa cerca de 70 genes alvos regulados por oxigênio. HIF-1 é uma proteína heterodimérica composta por dois membros da família de proteínas contendo o domínio *basic helix-loop-helix* (bHLH)-PER-ARNT-SIM (PAS), HIF-1 α (atua unicamente na resposta à hipóxia) e o HIF-1 β (também conhecido como translocador nuclear do receptor de aril hidrocarbono, ARNT, que é constitutivamente expresso). A estabilidade e a atividade do HIF-1 α são reguladas por modificações pós-traducionais, tais como fosforilação, hidroxilação, nitrosilação e acetilação. Sob normóxia, HIF-1 α é constitutivamente expresso e subsequentemente hidroxilado pela HIF proil hidroxilase (HPH) levando-o a ser rapidamente marcado para a degradação mediada pelo proteasoma. A seqüência de eventos que leva a ativação do HIF-1 α e os efeitos paradoxais do HIF-1 (efeitos pro- e anti-apoptóticos) não são completamente entendidos. Também não estão claros como os mecanismos dependentes e independentes de oxigênio que contribuem para as modificações pós-traducionais do HIF-1 α , translocação nuclear, heterodimerização com o ARNT, ligação ao DNA em regiões regulatórias *cis* de genes alvos e recrutamento de cofatores. Portanto, as proteínas que interagem com o HIF-1 α e as modificações pós-traducionais precisam ser melhor entendidas. Células de leveduras compartilham vários aspectos de sua bioquímica com os organismos multicelulares tais como, respostas transcricionais e celulares e mecanismos de modificações pós-traducionais de proteínas. Além disso, elas são fáceis de manipular sob diferentes condições de laboratório. Este trabalho visou avaliar a viabilidade da expressão do HIF-1 na levedura *Saccharomyces cerevisiae* como um modelo alternativo de expressão. Em células de leveduras, HIF-1 não é alvo de degradação sob condições de normóxia, já que esse microorganismo não possui a via de degradação mediada pelo von Hippel Lindau (proteína supressora de tumor). Pretendemos usar esse modelo de expressão para estudar as modificações pós-traducionais do HIF-1 α e sua interação com outras proteínas que possam afetar sua dimerização/co-ativação, sob diversas condições. Estabelecemos então uma

linhagem de levedura que expressa o HIF-1 α e o ARNT constitutivamente sob condições normais de oxigênio. Também mostramos que o HIF-1 α recombinante humano foi capaz de formar o heterodímero com o ARNT e se ligar ao elemento responsivo a hipóxia (HRE) da eritropoietina humana. Além disso, nós descrevemos a presença desse motivo no genoma de levedura e mostramos que esse organismo pode conter motivos HRE funcionais.

Abstract

The hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a central regulator in the response to changes in oxygen concentration and plays an important role in physiological and pathological processes in humans. This transcription factor is expressed when mammalian cells are subjected to hypoxia and activates transcription of over 70 oxygen-regulated target genes. HIF-1 is a heterodimeric protein composed of two members of the basic helix-loop-helix (bHLH)-containing PER-ARNT-SIM (PAS) domain family, HIF-1 α (unique to the hypoxia response) and HIF-1 β (also known as the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT, which is constitutively expressed). HIF-1 α stability and activity are regulated by post-translational modifications such as phosphorylation, hydroxylation, nitrosation and acetylation. Under normoxia, HIF-1 α is constitutively expressed and subsequently hydroxylated by a HIF prolyl hydroxylase (HPH) causing it to be rapidly targeted for proteasome-mediated degradation. The sequence of events that leads to the full activation of HIF-1 α and the paradoxical effects of HIF-1 (pro- and anti-apoptotic effects) are not completely understood. Neither is clear how oxygen-dependent nor oxygen-independent mechanisms contribute to the post-translational modifications of HIF-1 α , nuclear translocation, heterodimerization with ARNT, DNA binding to the cis-regulatory region of target genes and recruitment of cofactors. Therefore, HIF-1 α interacting partners and the post-translational modifications need to be better elucidated. Yeast cells share several aspects of its biochemistry with multicellular organism such as, transcriptional and cellular responses and mechanisms of protein post-transcriptional modifications. In addition they are easy to manipulate under different laboratory conditions. This work aimed to evaluate the viability of HIF-1 expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as an alternative expression model. In yeast cells, HIF-1 may not be targeted to degradation under normoxic conditions, since this microorganism lacks the pathway mediated by the von Hippel Lindau-VHL (a tumor suppressor protein). We intend to use this expression model to study the post-translational modifications and its interaction with other proteins that may affect its dimerization/co-activation. We established a yeast strain over-expressing HIF-1 α and ARNT in a constitutive manner under normal conditions of

oxygen. We also showed that recombinant HIF-1 α was able to form a heterodimer with ARNT and bind to human erythropoietin hypoxia responsive element (HRE) motif. Additionally, we described the presence of this motif in the yeast genome and showed that this organism may harbor HRE motifs.

I. Introdução

1. Hipóxia e Fator Induzível por Hipóxia-1 (HIF-1)

Células respondem a estímulos extra- e intracelulares para manter a homeostase, e a hipóxia é um dos mais fundamentais de todos os estímulos ambientais. A homeostase do oxigênio é de importância crucial para todas as células de mamíferos, pois muito (hiperóxia) ou pouco (hipóxia) oxigênio resulta em sua toxicidade. A manutenção dos níveis de oxigênio dentro de limites normais é essencial ao longo da vida, mas é particularmente importante durante períodos de proliferação celular rápida, que ocorre durante o crescimento normal, e no desenvolvimento de neoplasias. Em tecidos normais a tensão média de oxigênio é entre 40 a 50 mmHg, enquanto em tumores esses níveis chegam de 5 a 10 mmHg (Hokhel *et al.*, 1991, Rampling *et al.*, 1994). O controle dos níveis de oxigênio nos tecidos de animais ocorre através da combinação da regulação gênica e de mecanismos bioquímicos e fisiológicos (Pugh *et al.*, 2001).

Um melhor entendimento sobre a base molecular da homeostase de oxigênio originou-se de estudos sobre o controle da expressão do gene da eritropoietina (EPO). Este hormônio é central no processo que regula a oxigenação dos tecidos, pois leva a um aumento da produção de células sanguíneas vermelhas em resposta a hipóxia nos tecidos, e conseqüente aumento do fornecimento de oxigênio aos tecidos (Krantz, 1991). Os níveis de eritropoietina são controlados principalmente pela regulação transcricional da expressão do seu gene por um *enhancer* regulado por hipóxia que está localizado na região 3' do gene (Semenza *et al.*, 1991). Foi inicialmente considerado que a regulação da transcrição do gene da eritropoietina por hipóxia provavelmente representaria um caso especial. No entanto, vários estudos demonstraram que a eritropoietina faz parte do mecanismo central de expressão gênica regulada por oxigênio, eficaz na maioria, se não todos, os tipos de células (Maxwell *et al.*, 1997). A análise do *enhancer* da eritropoietina mostrou a presença de um elemento responsivo à hipóxia (HRE), uma região regulatória com a seqüência 5'-BRCGTGVBBB-3' (onde B= C, G ou T; R= A ou G e V= A, C ou G), onde o Fator Induzível por Hipóxia-1 (HIF-1) se liga especificamente à região central

(5'-RCGTG-3') chamada de sítio de ligação do HIF-1 (HBS) (Wang e Semenza, 1993). O HIF-1 tem um papel importante em processos fisiológicos e patológicos e estão representados na Figura 1. Como mostrado na figura 1, os processos fisiológicos nos quais o HIF-1 tem um papel crucial como regulador são: metabolismo energético, homeostase de ferro, viabilidade e proliferação celular e angiogênese (circulo interno). Os processos patológicos (circulo externo) onde o HIF-1 tem um papel como regulador são: câncer, isquemia do miocárdio, preclampsia, retardamento do crescimento fetal intrauterino, hipertensão pulmonar e isquemia cerebral (Semenza, 2000).

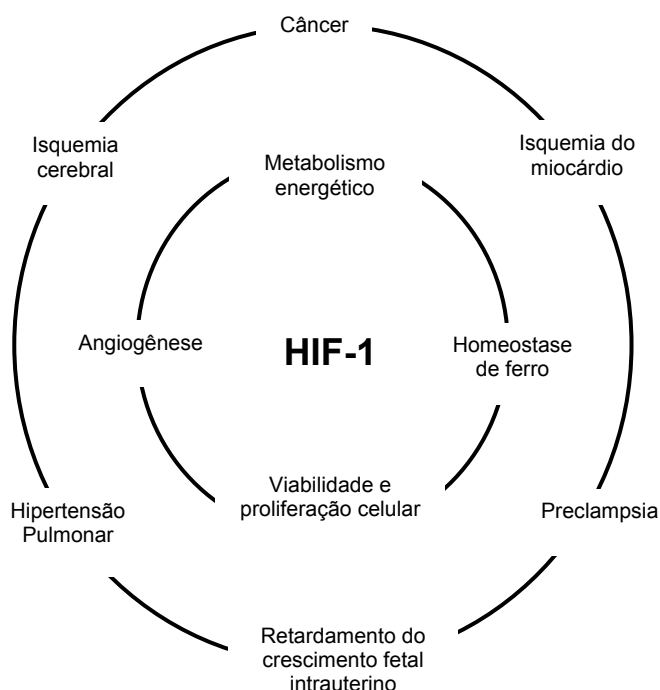


Figura 1. Representação esquemática dos processos fisiológicos e patológicos nos quais o HIF-1 tem uma função como regulador central. A transativação de genes alvos pelo HIF-1 contribui para ambas respostas adaptativas (círculo interno) e patológicas (círculo externo). Fonte: Semenza (2000).

2. Estrutura do HIF-1

O HIF-1 é um fator de transcrição que funciona na forma de heterodímero e pertence à família de fatores de transcrição *basic-helix-loop-helix-PAS* (bHLH-PAS).

O HIF-1 é composto pelas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β (conhecida também como translocador nuclear receptor de aril hidrocarbono, ARNT) (Wang *et al.*, 1995a). Cada subunidade tem dois domínios PAS, designados PAS-A e PAS-B. O domínio PAS foi designado como uma região comum encontrada no gene *per* de *Drosophila*, um gene componente do ciclo circadiano (Jackson *et al.*, 1986), ARNT humano (Hoffman *et al.*, 1991) e no gene *sim* de *Drosophila*, um gene crucial na regulação do desenvolvimento do sistema nervoso central (Nambu *et al.*, 1991).

Os domínios bHLH de HIF-1 α e HIF-1 β são essenciais para a dimerização e ligação destas proteínas ao DNA (D'Angio e Finkelstein, 2000). Existem outras proteínas que também pertencem à família bHLH-PAS, tais como: ARNT2, ARNT3, Ahr (receptor de aril-hidrocarbono, também chamado de receptor de dioxina) que participam no metabolismo de compostos xenobióticos (Takahata *et al.*, 1998; Swanson *et al.*, 1995), CLOCK (proteína que participa da homeostase de oxigênio e do ciclo circadiano) (Albrecht *et al.*, 1997), HIF-2 α , HIF-3 α (resposta à hipóxia) (Maranchie *et al.*, 2002, Maynard *et al.*, 2003), SIM1 e SIM2 (neurogênese) (Ema *et al.*, 1996).

O gene *hif1-a* humano que codifica a proteína HIF-1 α possui 2.478 pares de base e a proteína consiste de 826 aminoácidos, com uma massa molecular que varia de 104 kDa a 116 kDa (Richard *et al.*, 1999). O *hif1-a* encontra-se no cromossoma 14 e consiste de 15 exons interrompidos por 14 introns. O exon 2 codifica o domínio bHLH, enquanto a região que vai do exon 3 ao exon 8 codifica o domínio PAS. A região carboxi-terminal, que compreende os domínios responsáveis pela ativação e estabilidade da proteína, é codificada nos exons 9 a 15 (Iyer *et al.*, 1998). A Figura 2 mostra o esquema da estrutura dos genes do HIF-1. O HIF-1 α contém dois domínios de transativação, um no N-terminal (TAD-N) que se sobrepõe com o domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD) e um outro na região C-terminal (TAD-C) da proteína que é capaz de interagir com coativadores transcricionais tais como CBP/p300. Ambos domínios estão conectados um ao outro por um domínio inibitório (Semenza, 2000).

O gene *arnt* humano localiza-se na região q21 do cromossoma 1 e possui 22 exons (Johnson *et al.*, 1993). O gene processado que codifica para o ARNT possui 2.367 pares de base e a proteína consiste de 789 aminoácidos com uma massa molecular de 94 kDa. O *arnt* possui duas formas variantes após o processamento do

RNA. O exon 5, o qual possui 45 nucleotídeos é um exon alternativo e pode ser processado, resultando assim em um transcrito com 2.322 pares de base o qual codifica para uma proteína de 774 aminoácidos. Esse processamento acontece em cerca de 50% dos *arnt* transcritos e essa proporção não parece variar muito entre os diferentes tecidos. Apesar de o ARNT possuir duas formas variantes, nenhum efeito diferenciado nas células foi observado na forma onde o exon 5 foi omitido (Scheel *et al.*, 2002). O ARNT é uma proteína nuclear constitutivamente expressa que também participa na resposta transcricional a agentes xenobióticos. O ARNT é capaz de formar um outro complexo com o receptor de aril hidrocarbono (Ahr). Este complexo se liga ao elemento responsivo a xenobióticos (XRE), encontrado em muitos genes, tais como o gene *CYP1A1* que codifica o citocromo P450 com atividade hidrocarbono hidroxilase e NADP(H):oxiredutase. A ativação desses genes depende primariamente da ligação do Ahr a ligantes xenobióticos, incluindo 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina (dioxina) e benzo(a)pireno (Ema *et al.*, 1992). Enquanto o ARNT contém um domínio de ativação transcricional, HIF-1 α e HIF-2 α têm dois domínios de transativação, TAD-N e TAD-C (Jiang *et al.*, 1996; Giaccia *et al.*, 2003).

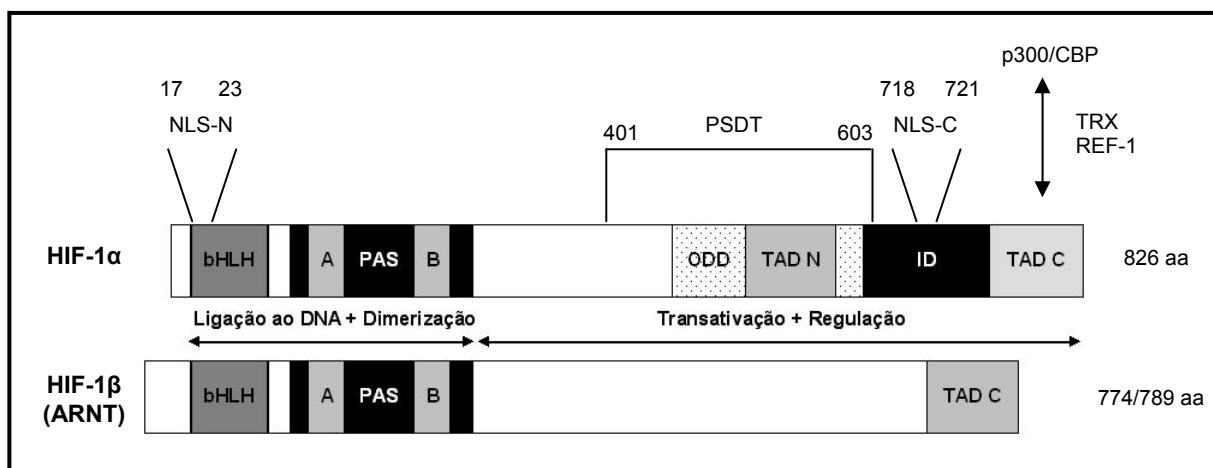


Figura 2. Representação esquemática das proteínas que constituem as duas subunidades do HIF-1 humano. Os domínios de importância funcional das subunidades HIF-1 α e ARNT estão indicados da seguinte forma: bHLH, domínio "helix-loop-helix" básico; NLS-N e NLS-C, sinais de localização nuclear amino e carboxi- terminal; PAS, domínio de homologia *Per-ARNT-Sim* com repetições A e B; PSTD, domínio de estabilidade da proteína rico em prolina-serina-treonina; TAD-N e TAD-C, domínios de transativação amino e carboxi- terminal; ODD, domínio de degradação dependente de oxigênio; REF-1, TRX, p300/CBP, indicam as regiões do HIF-1 α onde o fator 1 redox,

a tioredoxina e os coativadores p300/CBP se ligam. Os números indicam os resíduos de aminoácidos que delimitam as regiões funcionais das duas subunidades do HIF-1 humano. Fonte: Semenza (2000).

3. Coativadores do HIF-1

O mecanismo de transativação pelo HIF-1 envolve a ligação do complexo HIF-1 α /ARNT aos motivos HREs localizados nos promotores e *enhancers* dos genes alvos. Para a ativação dos genes alvos vários coativadores são recrutados se ligando ao complexo do HIF-1, tais como o complexo CBP (*CREB binding protein*)/p300. Em adição ao CBP/p300, HIF-1 interage com o coativador SRC-1 (coativador 1 do receptor de esteróide) e com o Tie-2 (fator intermediário 2 da transcrição) (Giaccia *et al.*, 2003; Carrero *et al.*, 2000). Essa interação aumenta o potencial transcricional do HIF-1 de uma maneira dependente de oxigênio e produz um efeito sinérgico com CBP. Esse efeito é fortemente potencializado pela proteína regulatória do estado redox Ref-1, uma proteína que tem atividade redutora de cisteína (Carrero *et al.*, 2000). Ref-1 interage fisicamente com ambos domínios TAD-C e TAD-N, levando a uma transativação mais potente. Adicionalmente, a ligação do HIF-1 aos HREs não é suficiente para indução de muitos genes pela hipóxia. Tem-se verificado cooperações sinérgicas entre HIF-1 α ou HIF-2 α e outros fatores de transcrição, tais como Smad3, HNF4, ATF1/CREB1, AP1, e Ets-1 (Bracken *et al.*, 2003). Uma indução ótima, dependente de HIF-1 α , do promotor do VEGF foi obtida na presença do Smad3. Esses fenômenos poderiam contribuir para a regulação diferencial dos diversos genes ativados por HIF-1. Futuros trabalhos irão sem dúvida levar a descobertas de novos fatores de transcrição que modulam a atividade do HIF-1 de uma maneira dependente do tipo celular e dos genes específicos.

Minet *et al.* (1999) demonstraram o papel da Hsp90 (proteína de choque térmico) na ativação do HIF-1 α em condições de hipóxia. Os autores mostraram que a inibição da atividade da Hsp90 pela geldanamicina levou a um decréscimo na ativação do HIF-1 α em hipóxia. Esses autores também mostraram a formação do complexo HIF-1 α /Hsp90 sob normóxia sendo essa interação dependente do domínio bHLH-PAS. Foi verificado que não só a Hsp90 interage com o HIF-1 α , mas também com o Ahr. A associação do receptor Ahr à Hsp90 o mantém em um estado pré-

ativado, no entanto latente. Quando um agente xenobiótico, por exemplo, a doxina está presente, o Ahr é dissociado da Hsp90 formando um complexo com o ARNT e, portanto levando a transativação de genes alvos. Assim, a atividade do Ahr é regulada através de sua interação com a Hsp90 e com o ARNT (Minet *et al.*, 1999; Isaacs *et al.*, 2004).

4. Regulação do HIF-1

Embora a atividade de muitos fatores de transcrição, incluindo fos, jun e p53, seja afetada pela oxigenação dos tecidos, portanto influenciando a regulação gênica, tem se tornado mais aparente que HIF-1 é o fator de transcrição dominante que regula a expressão gênica em resposta aos níveis de oxigênio (Wenger e Gassmann, 1997; Pugh *et al.*, 2001). Sabe-se que a habilidade e atividade do HIF-1 α são reguladas por várias modificações pós-traducionais tais como, hidroxilação (Bruick e McKnight, 2001), acetilação (Jeong *et al.*, 2002), nitrosilação (Yasinska e Sumbayev, 2003) e fosforilação (Richard *et al.*, 1999). No entanto, pouco se sabe sobre o “controle fino” dessas modificações do HIF-1 α em relação à sua atividade.

4.1. Fosforilação

Antes mesmo de se verificar a participação de prolil-hidroxilase (hidroxilação do HIF-1 α) na via de regulação do HIF-1 α , vários trabalhos mostraram o envolvimento da fosforilação na transdução de sinal para ativação gênica (Mylonis *et al.*, 2006, Kwon *et al.*, 2005). No entanto, a regulação da atividade transcricional do HIF-1 α pela fosforilação é ainda pouco entendida. Muitos genes/oncogenes supressores de tumor influenciam ou são constituintes de cascatas de fosforilação e assim afetam os níveis de expressão do HIF-1 α independente do oxigênio. Interessantemente, essas cascatas podem ser iniciadas após fatores de crescimento se ligarem aos receptores de tirosina quinases, que por sua vez ativam os alvos posteriores da via. Exemplos de fatores de crescimento e citocinas que regulam e estabilizam o HIF-1 α sob condições de normóxia: fator de crescimento epidermal, fator de crescimento do fibroblasto, interleucina-1 β e fatores 1 e 2 de crescimento

semelhante à insulina (IGF1 e IGF2) (Feldser *et al.*, 1999; Hellwig-Burgel *et al.*, 1999; Laughner *et al.*, 2001; Zelzer *et al.*, 1998). Isto é importante porque diferentes níveis de fatores de crescimento e de seus receptores podem modular/ativar a via do HIF-1 através da estimulação da cascata de fosforilação.

Existem duas vias principais de fosforilação envolvidas na ativação do HIF-1, vias da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (Figura 3). As três grandes sub-famílias das vias das MAPK, denominadas c-Jun NH₂-terminal quinases (JNKs), p38 MAPKs, e as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) mostraram ser reguladoras do HIF-1 α (Alfranca *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2002; Minet *et al.*, 2001; Shemirani e Crowe, 2002; Richard *et al.*, 1999). Inicialmente, foi sugerido que a via de MAPK estaria envolvida somente na atividade de transativação através da fosforilação e não influenciaria a estabilização ou habilidade de ligação do HIF-1 ao DNA (Hur *et al.*, 2001). Foi verificado que inibidores de MEK1 ou p38 MAPK bloqueiam a expressão gênica mediada por HIF-1, demonstrando assim a importância da via da MAPK na funcionalidade do HIF-1 α (Richard *et al.*, 1999). Embora ambas MAPK fosforilem o HIF-1 α *in vitro*, estudos com mutações nos sítios de fosforilação do HIF-1 α sugerem que sua transativação não é afetada ou mediada diretamente pela fosforilação. É possível que MAPKs exerçam seus efeitos em cofatores do HIF-1 (Huang e Bunn, 2003). Tem sido sugerido que a sinalização via MAPK afeta a atividade de transativação do p300, possivelmente regulando a interação entre p300 e TAD-C (Sang *et al.*, 2003). A ativação da via da MAPK aumenta os níveis de síntese do HIF-1 α (Fukuda *et al.*, 2002) através da indução do fator de iniciação de eucariotos eIF-4E.

A cascata de sinalização pela PI3K representa uma outra via de fosforilação do HIF-1 α . A proteína quinase que é ativada posteriormente à ativação de PI3K, conhecida como AKT, tem alguns alvos envolvidos na apoptose, no ciclo celular, e no crescimento celular (Vivanco e Sawyers, 2002). Um dos alvos é a proteína associada a rapamicina/FKBP [FRAP; também conhecida como mTOR (alvo da rapamicina de mamífero)]. FRAP fosforila a proteína regulatória da tradução 4E-BP que por sua vez aumenta os níveis transcricionais (Gingras *et al.*, 2001; Raught *et al.*, 2001). Essa via é também regulada por PTEN, uma proteína supressora de tumor, pela glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), envolvida na estabilização do HIF-1 α em condições de hipóxia por mecanismos ainda desconhecidos (Mottet *et al.*, 2003) e pela proteína Ras, um oncogene multifuncional que pode estimular ambas

as vias da MAPK e do PI3K (Pouyssegur *et al.*, 2002; Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994).

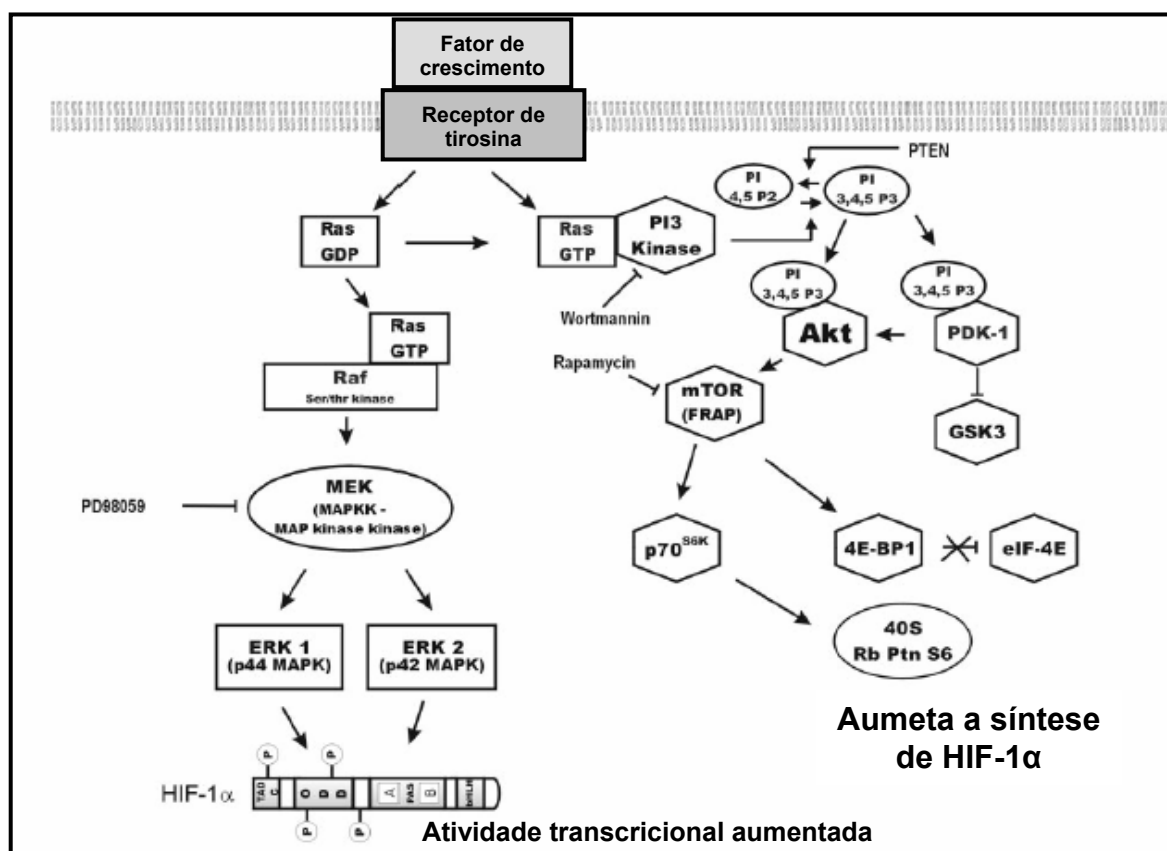


Figura 3. Esquema das duas principais vias de fosforilação do HIF-1 α . ERK, proteína quinase relacionada a sinal extracelular; GSK3, glicogênio sintase quinase-3; PDK1, proteína quinase-1 dependente de fosfatidilinositol; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; MEK, quinases ativadoras de MAP-ERK; MEKK, MEK-quinase; mTOR, alvo de rapamicina de mamífero; PI, fosfatidilinositol; PTEN, fosfatase e homóloga a tensina; p70S6K, p70 proteína ribossomal S6 quinase; 4E-BP1, proteína ligante 4E; eIF-4E, fator de iniciação da tradução eucariótico 4E; 40S Rb Ptn S6, 40S proteína ribossomal S6. Fonte: Höpfl *et al.* (2004).

A regulação da atividade transcritorial do HIF-1 α pelas MAP quinases (proteínas quinases ativadas por mitógeno) é ainda pouco entendida. Richard *et al.* (1999) mostraram que o HIF-1 α é altamente fosforilado *in vivo* e que as MAP quinases p42/p44 aumentam em duas vezes os níveis de fosforilação do HIF-1 α *in vitro*. No entanto, a cascata regulatória onde atuam p42/p44 não modula a degradação/estabilização do HIF-1 α (Berra *et al.*, 2001). Sob condições de normóxia, HIF-1 α é constitutivamente expresso e subsequentemente hidroxilado pela HIF-1 prolil hidroxilase (HPH) levando o HIF-1 α a ser rapidamente degradado

pelo proteasoma. Essa degradação envolve a ação de um complexo de ubiquitina-ligase contendo o fator von Hippel Lindau, uma proteína supressora de tumor (pVHL) (Maxwell *et al.*, 1999).

4.2. Hidroxilação

Sob condições de normóxia, o HIF-1 α é constitutivamente expresso e subseqüentemente hidroxilado por uma HIF prolil-hidroxilase (HPH) levando-o a uma rápida degradação mediada pelo proteassoma. Essa degradação envolve a ação de um complexo ubiquitina-ligase contendo o fator Von Hippel Lindau, uma proteína supressora de tumor (pVHL) (Maxwell *et al.*, 1999). A pVHL reconhece os resíduos de prolina hidroxilados (Pro402 and Pro564) presentes no domínio ODD do HIF-1 α (Bruick e McKnight, 2001). A prolil-hidroxilase é uma dioxigenase e usa O₂ e 2-oxoglutarato como substratos. Essa enzima transfere um átomo de O₂ para os resíduos de prolina e o segundo átomo de O₂ reage com o 2-oxoglutarato gerando o succinato. Ela também requer ferro como cofator, o qual se liga ao O₂ quando mantido no estado ferroso pelo ascorbato. Sua atividade é suprimida pelo decréscimo na tensão de O₂. Quando HPH é inibida a via de degradação do HIF-1 α é bloqueada, levando assim ao acúmulo dessa proteína e sua migração para o núcleo, onde ela ativa genes responsivos à hipóxia. Assim, HPH parece ser um componente essencial da via pela qual as células de mamíferos “sentem” o oxigênio (Bruick e McKnight, 2001). Esse mecanismo está mostrado na Figura 4.

Existem três HPH, 1, 2 e 3, conhecidas também como proteínas contendo o domínio de prolil-hidroxilase (PHD) 3, 2 e 1 respectivamente (note que a numeração é invertida). As PHDs hidroxilam prolinas específicas dentro de um domínio altamente conservado com a seguinte seqüência de aminoácido: LXXLAP (onde X indica qualquer aminoácido; P, indica a prolina receptora do grupo hidroxila, L, leucina e A, alanina) (Bruick e McKnight, 2001). Quanto à localização celular, a PHD1 encontra-se exclusivamente no núcleo, PHD2 no citoplasma e PHD3 é encontrada em ambos citoplasma e núcleo, com predominância no citoplasma. Somente os níveis dos mRNA de PHD2 e PHD3 são induzíveis por hipóxia, enquanto os níveis de expressão do mRNA de PHD1 independem da hipóxia (Metzen *et al.* 2003).

A interação do complexo CBP/p300 com o HIF-1 α é sensível aos níveis de oxigênio, sendo inibida após a hidroxilação de um resíduo de asparagina (Asn803) no domínio TAD-C do HIF-1 α por uma asparaginil hidroxilase (Figura 4), também conhecida como fator inibidor de HIF-1 (FIH) (Lando *et al.*, 2002a). Similar às prolil-hidroxilases, FIH pertence à superfamília das dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato cuja atividade requer O₂ como substrato (Lando *et al.*, 2002a; Lando *et al.*, 2002b). A hidroxilação do resíduo de asparagina não leva à degradação do HIF-1 α e portanto não está diretamente envolvida no mecanismo sensor de oxigênio. A inibição da hidroxilação do resíduo de aminoácido Asn803 permite que o TAD-C interaja com o domínio rico em cisteína e histidina dos cofatores de transcrição, CBP/p300 (Ema *et al.*, 1999).

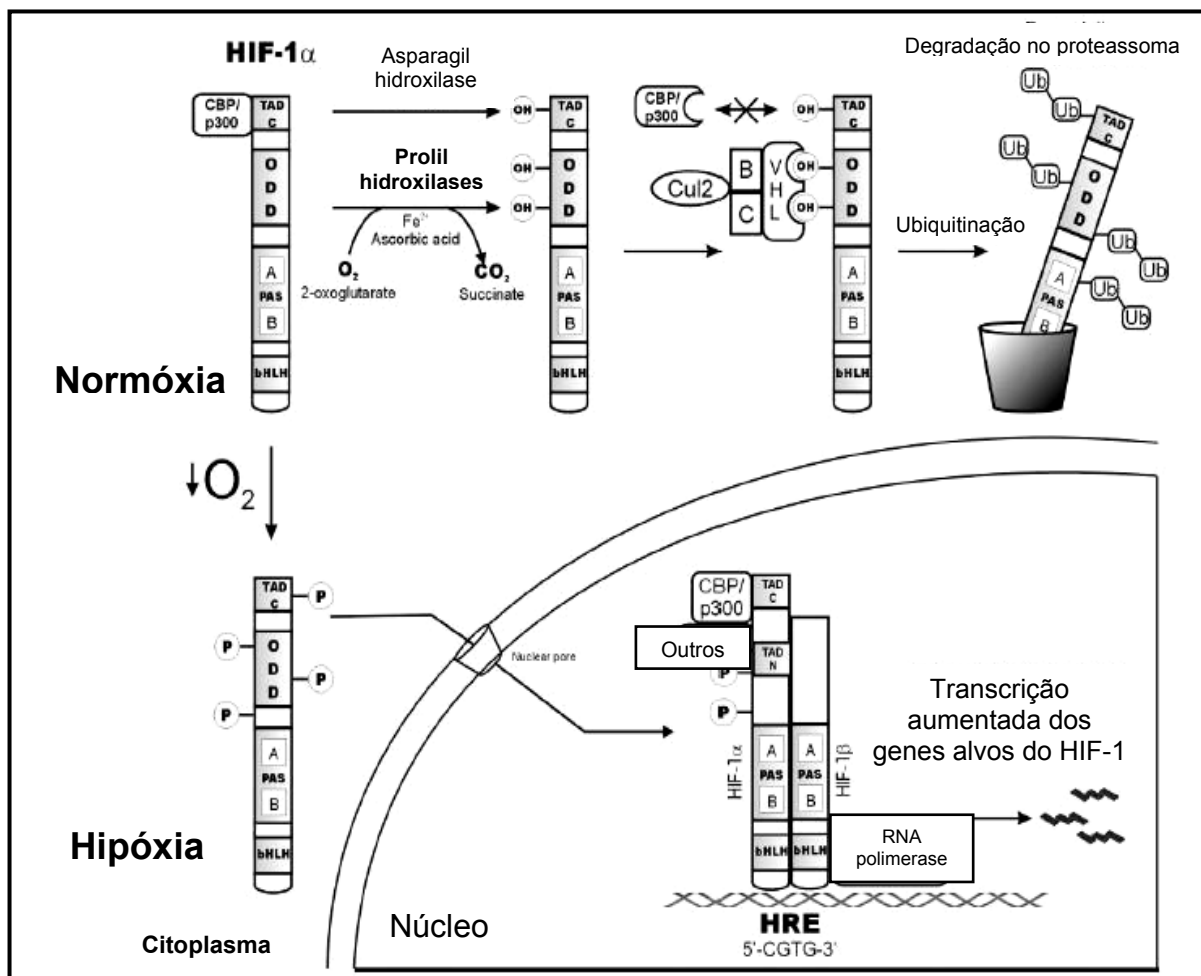


Figura 4. Representação esquemática do mecanismo de regulação da expressão gênica do fator 1 induzível por hipóxia α (HIF-1 α). Sob condições de normóxia o HIF-1 α é hidroxilado pelas hidroxilases nos resíduos de asparagina e prolina. Essas enzimas usam como substratos o O_2 e 2-oxoglutarato. O reconhecimento dos resíduos de prolina hidroxilados (P402 e P564) da subunidade HIF-1 α sob condições de normóxia se dá pela proteína supressora de tumor von Hippel Lindau (VHL), que faz parte de um complexo de proteínas, constituído pela elonguina B e C e culina 2. O HIF-1 α é ubiquitinado e então degradado pelo proteossoma. Sob condição de hipóxia: ocorre a heterodimerização das subunidades HIF-1 α fosforilada e HIF-1 β (ARNT) que se ligam à uma seqüência consenso de DNA (5'-RCGTG-3'; onde R = adenina ou guanina) que está contida dentro da seqüência conhecida como elemento responsivo à hipóxia HRE, existente nos genes alvo. Fonte: Höpfl *et al.* (2004).

Em condições de hipóxia, HIF-1 α transloca-se para o núcleo formando o heterodímero com o ARNT, onde se ligam ao motivo HRE dos genes alvo. Chilov *et al.* (1999) mostraram que o acúmulo de HIF-1 α no núcleo em células submetidas à

hipóxia é uma característica intrínseca desse fator de transcrição já que ele é independente da presença do ARNT. Sob condição de hipóxia, HIF-1 α não é degradada e assim seus genes alvos são expressos e uma resposta fisiológica à concentração de oxigênio é ativada.

4.3. Acetilação e Nitrosação

Foi verificado que o resíduo do aminoácido lisina 532 (K532) localizado no domínio ODD do HIF-1 α é acetilado por uma acetiltransferase chamada **arrest-defective-1** (ARD1) (Jeong *et al.*, 2002). ARD1 foi originalmente identificada na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e recebeu este nome devido ao fenótipo de leveduras mutantes deficientes no ciclo celular mitótico (Whiteway e Szostak, 1985). A acetilação da K532 favorece a interação do HIF-1 α com o pVHL e assim desestabiliza o HIF-1 α (Jeong *et al.*, 2002). Uma mutação na K532, substituindo-a por um resíduo de arginina resulta em uma estabilidade aumentada do HIF-1 α (Tanimoto *et al.*, 2000). Assim o resíduo K532 está envolvido na desestabilização do HIF-1 α . Além disso, um aumento no estado acetilado do HIF-1 α através do uso de ácido butírico, um inibidor geral de deacetilases, leva a uma diminuição nos níveis da proteína HIF-1 α (Kim *et al.*, 2001). A atividade das acetiltransferases não é alterada pelos níveis de oxigênio. Mas os níveis do mRNA do ARD1 (e conseqüentemente da proteína) diminuem sob condições de hipóxia, o que leva a um menor nível de acetilação do HIF-1 α do que sob normóxia (Jeong *et al.*, 2002).

O óxido nítrico (NO) promove a estabilização do HIF-1 α , ligação ao DNA e a sua transativação sob condições de normóxia. Essa ação do NO sobre a atividade do HIF-1 α foi verificada em estudos usando as linhagens celulares: células tubulares de suíno (LLC-PK₁), glioblastoma e hepatoma humanos e células endoteliais da artéria pulmonar bovina. Essas células, quando tratadas com diversos doadores de NO, tais como S-nitroglutationa, (Z)-1-[2-(2-aminoetil)-N-(2-amônioetil)amino] diazen-1-o-1,2-diolato (NOC-18) e 3-[2-hidroxi-1-(1-metiletil)-2-nitrosodiazino]-1-propanamina (NOC-5), S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP) apresentaram um acúmulo de HIF-1 α . Nesses estudos os autores verificaram níveis aumentados do VEGF humano quando as células foram tratadas com esses compostos doadores de NO e submetidos a condições de normóxia (Brüne e Zhou, 2003). Tem se tornado

claro que além da hipóxia outros fatores contribuem para o acúmulo do HIF-1 α e a transativação do HIF-1, algo inesperado durante a normóxia. Entre os fatores envolvidos, NO ganhou uma considerável atenção. Sob condições de hipóxia o NO desfavorece o acúmulo de HIF-1 α , porém sob condições de normóxia o NO favorece esse acúmulo e, portanto “mimetiza” a hipóxia.

5. As isoformas do HIF

Além do HIF-1 α , existem dois membros adicionais da superfamília bHLH-PAS: HIF-2 α , referido como o domínio PAS da proteína endotelial 1 (EPAS1) e HIF-3 α (Tian *et al.*, 1997). Essas isoformas têm similaridade estrutural e são classificadas como família bHLH-PAS (Figura 5). A estrutura e funções do HIF-1 α foram mais extensivamente estudadas em relação ao HIF-2 α ou -3 α . Cinco isoformas do HIF-1 α são conhecidas: HIF-1 α^{FL} é similar ao HIF-1 α tipo selvagem (HIF-1 α^{WT}), exceto por três pares de base adicionais, TAG entre os exon 1 e o 2. HIF-1 α^{736} não contém o exon 14. Portanto, ele não possui o domínio de transativação C-terminal. HIF-1 α^{FL} e HIF-1 α^{736} ativam o promotor de VEGF sob condições de hipóxia (Gothie *et al.*, 2000). Em contraste ao HIF-1 α^{FL} e HIF-1 α^{736} , HIF-1 α^{557} (HIF-1 αZ) e HIF-1 α^{516} funcionam como isoformas dominantes negativas do HIF-1 α . HIF-1 αZ não possui o exon 12 e HIF-1 α^{516} não possui os exons 11 e 12. HIF- αZ é induzida por íons zinco (Chun *et al.*, 2001; Chun *et al.*, 2002). O HIF-1 α^{785} contém todos os domínios funcionais de HIF-1 α^{WT} , portanto, ele age como um ativador transcricional, mas não contém o exon 11 no domínio ODD (Chun *et al.*, 2003). Os papéis das subunidades 2 α e 3 α são pouco conhecidos. Assim como HIF-1 α , HIF-2 α também é regulado por hidroxilação enzimática do resíduo conservado de prolina, o que causa sua degradação sob normóxia via complexo ubiquitina-E3-ligase (Maxwell *et al.*, 1999, Tanimoto *et al.*, 2000).

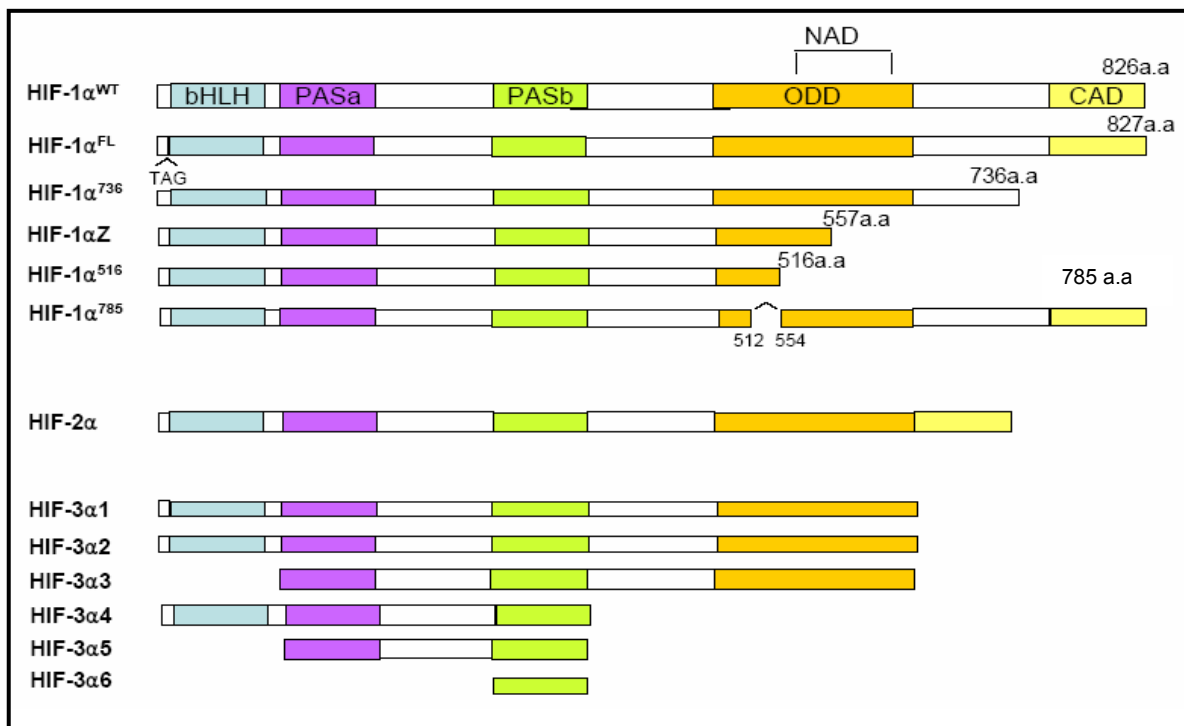


Figura 5. Isoformas da subunidade α do HIF-1 humano. bHLH, *basic-helix-loop-helix*; PAS, domínio Per/Arnt/Sim; ODD, domínio de degradação dependente de oxigênio; NAD (ou TAD-N), domínio de transativação N-terminal; CAD (ou TAD-C), domínio de transativação C-terminal. Fonte: Lee *et al.* (2004).

HIF-3 α também sofre degradação através da via de poliubiquinação/ proteasoma (Maynard *et al.*, 2003). HIF-3 α humano tem múltiplas variantes produzidas a partir de seu processamento (todos não contêm o domínio TAD-C): hHIF-3 α 1-6 (Figura 5). hHIF-3 α 1, 2 e 3 possuem um domínio ODD comum que inclui o motivo consenso de reconhecimento da enzima prolina hidroxilase onde se liga ao complexo VHL E3 ligase sob condições de normóxia. HIF-3 α 2 é um regulador dominante negativo do HIF-1 α . Esse variante é chamado de IPAS (proteína inibitória com domínio PAS), o qual previne a interação do HIF-1 α com o HIF-1 β , porque dimeriza-se com o HIF-1 α e o complexo IPAS/HIF-1 α não se liga aos elementos responsivos à hipóxia. Dessa forma o IPAS age como um antagonista do sistema HIF-1 interferindo na expressão dos genes alvos (Makino *et al.*, 2002). Tem-se sugerido que o HIF-3 α 4 também pode agir como um regulador negativo do HIF-1 (Maynard *et al.*, 2003).

O efeito dos diferentes membros da família do HIF na expressão gênica pode ser diferente de acordo com os tipos celulares. Por exemplo, HIF-1 α e -2 α são abundantemente expressos no rim, enquanto foi verificada uma alta expressão de HIF-3 α em células Purkinje do cerebelo e epitélio da córnea em camundongos (Makino 2001). Estudos feitos por Sowter *et al.* (2003), mostraram que as funções do HIF-1 α e do HIF-2 α são específicas para cada tipo celular. Por exemplo, HIF-1 α é a isoforma mais requerida para a indução de genes hipóxicos nas linhagens de células de câncer de mama MDA 468 e MDA 435 e HUVECs (células do endotélio da veia umbilical humana). Entretanto, a super-expressão do HIF-2 α , mas não de HIF-1 α promove o crescimento de células de carcinoma renal (Maranchie *et al.*, 2002, Kondo *et al.*, 2002, Sowter *et al.*, 2003). Numa linhagem de célula de câncer de mama, foi mostrado que o HIF-1 α tem papel predominante na indução de genes hipóxicos em relação ao papel das demais isoformas (Blancher *et al.*, 2000). Enquanto o HIF-1 α tem sido extensivamente estudado por sua capacidade de ativar a transcrição, existe um crescente interesse sobre o papel do HIF-2 α e a distinção dos papéis que as diferentes subunidades do HIF-1 têm durante o desenvolvimento e patogênese. HIF-2 α tem uma distribuição mais restrita dentro dos tecidos do que HIF-1 α . A proteína HIF-2 α é detectada em maiores quantidades em células dos tecidos vasculares e macrófagos da medula óssea (Tian *et al.*, 1997), pulmões, endotélio e corpo carótido (Ema *et al.*, 1997). Foi verificado também que o HIF-2 α media a ativação transcricional da expressão da eritropoietina em astrócitos cultivados (Chavez *et al.*, 2006). A inativação do HIF-1 α e HIF-2 α causa diferentes defeitos de desenvolvimento em embriões de camundongos e respostas distintas à hipóxia e deprivação de glicose em células tronco embrionárias, sugerindo funções não redundantes do HIF-1 α e 2 α .

Ensaio de microarranjos e northern blot mostraram uma ampla variedade de genes alvos do HIF-1 conhecidos, tais como VEGF e GLUT-1 os quais são regulados tanto por HIF-1 α quanto por HIF-2 α . Esses ensaios também mostraram novos genes induzíveis por hipóxia tais como, as proteínas relacionadas com a diferenciação dos adipócitos, GRO-2 (proteína regulatória do crescimento) e BIRC-3 (*baculoviral IAP repeat-containing 3*) (Hu *et al.*, 2003). Uma característica que distingue HIF-1 α do HIF-2 α é a regulação específica dos genes glicolíticos por HIF-1 α . Além disso, os genes específicos de células endoteliais Tie-2 e FIK-1 parecem ser exclusivamente regulados por HIF-2 α (Hu *et al.*, 2003; Elvert *et al.*, 2003).

6. Genes alvos do HIF-1

Cerca de 70 genes alvos do HIF-1 são conhecidos, incluindo genes que codificam a eritropoietina (EPO), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e enzimas glicolíticas, como por exemplo, a fosfoglicerato quinase (PGK), fosfofrutoquinase 1 e 2 (PFK1 e PFK2), hexoquinase 1 e 2 (HXK1 e HXK2), enolase (ENO), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e várias outras (Semenza, 1996). Vários desses genes apresentam dois ou mais HREs funcionais em suas regiões regulatórias. Esses genes estão listados na Tabela 1. Baseado em resultados de microarranjo, Wenger *et al.* (2005) estimam que existam pelo menos 200 genes de mamíferos regulados por HIF-1, embora aparentemente nem todos eles sejam regulados diretamente pelo motivo HRE em suas regiões promotoras. Nesse caso, outros fatores de transcrição regulados por oxigênio e que sejam dependentes ou independentes do HIF podem ser responsáveis pela indução da transcrição pela hipóxia.

Tabela 1. Resumo dos genes alvos do HIF-1 de diversas espécies. Foram listados somente aqueles genes onde foram observadas a atividade de ligação ao DNA no motivo HRE (através de ensaios de EMSA) ou expressão dos genes (através de testes de transativação funcional). FS, seqüência flanqueadora; IVS, seqüência interveniente; UT, região não traduzida; H, humano; C, camundongo; D, Daphnia; R, rato; HC, hamster chinês; Co, coelho; V, vírus. Fonte: Wenger *et al.* (2005). Os genes foram listados de acordo com sua funções.

Seqüência do HRE	Localização	Nome/Função	Espécie
Genes envolvidos com o suprimento de oxigênio			
gccctACGTGctgtctca	3'FS +3065/+3082	Eritropoietina (eritropoiese)	H
gccctACGTGctgcctcg	3'FS +359/+376	Eritropoietina (eritropoiese)	C
tcagACGTGcgtgtggg	5'FS -163/-180	Eritropoietina (eritropoiese)	H
ttgtACGTGatgctgt	5'FS -252/-269	Globina-2 (transporte de O ₂)	D
ggcctACGTGatgatagc	5'FS -101/-118	Globina-2 (transporte de O ₂)	D
gagggGCGTGtctctgcc	5'FS -103/-86	Ferroquelatase (síntese de heme)	H
aggacACGTGtgcgcttt	5'FS -121/-104	BCRP (ligação do heme)	H
gaaatACGTGcgtttgt	5'FS -201/-184	Transferrina (transporte de ferro)	H
tgtgtACGTGcaggaaag	5'FS -185/-168	Transferrina (transporte de ferro)	H
agcgtACGTGcctcagga	5'FS -93/-76	Transferrina (transporte de ferro)	H
tctgtACGTGaccacact	5'FS -3639/-3544	Ceruloplasmina (oxidase de ferro)	H
tgcatACGTGggctccaa	5'FS -978/-961	VEGF (angiogênese)	H
tgcatACGTGggctccaa	5'FS +61/+78	VEGF (angiogênese)	R
gaacaACGTGgaattagt	5'FS +1408/+1425	Flt-1/VEGF-R1 (angiogênese)	C/(H)

agtggGCGTGggaaccg	5'FS -124/-107	Flk-1/VEGF-R2 ((angiogênese); HIF-2)	C
tagcgACGTGccggcg	5'FS -111/-128	Leptina (metabolismo e angiogênese)	H
tgactACGTGctgcctag	5'FS -229/-212	iNOS (diâmetro de vasos)	C
cggtACGTGtgatgtg	5'FS -5375/-5358	eNOS (diâmetro de vasos)	H
tgtgtGCGTGctacgtg	5'FS -5381/-5364	eNOS (diâmetro de vasos)	H
agcggACGTGctggcgtg	5'FS +322/+339	Heme oxigenase 1 (diâmetro de vasos)	C
agaggACGTGccacgcca	5'FS +350/+333	Heme oxigenase 1 (diâmetro de vasos)	C
aggcaACGTGcagccgga	5'FS -114/-131	Endotelina-1 (diâmetro de vasos)	H/(R)
aggcgACGTGctgccgg	5'FS -169/-151	Receptor α 1 β -adrenérgico (diâmetro de vasos)	R
ggcaaACGTGttcgaact	5'FS -1106/-1089	Adrenomedulina (diâmetro de vasos)	C
gggacACGTGtgtgtacg	5'FS -156/-173	PAI-1 (fluxo sanguíneo)	R
tgtgtACGTGtgaagag	5'FS -202/-185	PAI-1 (fluxo sanguíneo)	H
tggagACGTGcagagcat	5'FS -1775/-1758	ANP (volume do sangue)	R

Metabolismo celular

ggcgtACGTGctgcaggc	IVS1 +346/+363	Fosfofrutoquinase L (glicólise)	C
ctcggACGTGactcggac	5'FS -184/-201	Aldolase A (glicólise)	H
tcctcACGTGcggggacc	IVS4 +124/+141	Aldolase A (glicólise)	H
gagctACGTGcggccgta	5'FS -115/-132	GAPDH (glicólise)	H
tcggtGCGTGcccagttg	5'FS -212/-195	GAPDH (glicólise)	H
accgaGCGTGtggccccc	5'FS -208/-225	GAPDH (glicólise)	H
gccggACGTGacaaccg	5'FS -206/-189	Fosfoglicerato quinase 1(glicólise)	H
gtgagACGTGcggcttcc	5'FS -173/-190	Fosfoglicerato quinase 1(glicólise)	H
tgccgACGTGcgtccgg	5'UT +30/+13	Fosfoglicerato quinase 1(glicólise)	H
tcgcgTCGTGcaggacgt	5'FS -226/-209	Fosfoglicerato quinase 1(glicólise)	C
gcaggACGTGacaaatgg	5'FS -217/-200	Fosfoglicerato quinase 1(glicólise)	C
gtgagACGTGctacttcc	5'FS -184/-201	Fosfoglicerato quinase 1(glicólise)	C
ggggcACGTGcggccct	5'FS -590/-607	Enolase 1 (glicólise)	H
gccggACGTGgggcccga	5'FS -413/-396	Enolase 1 (glicólise)	H
tgagtGCGTGcgggactc	5'FS -386/-369	Enolase 1 (glicólise)	H
ggagtACGTGacggagcc	5'FS -368/-351	Enolase 1 (glicólise)	H
cctacACGTGggttccc	5'FS -89/-72	Lactato desidrogenase A (glicólise)	C
agcggACGTGcgggaacc	5'FS -62/-79	Lactato desidrogenase A (glicólise)	C
accccACGTGgttcttgg	5'FS -91/-74	Glicoquinase (glicólise)	R
gcgggACGTGacgcacgt	5'FS -1293/-1276	PFKFB3 (glicólise)	H
gacgcACGTGtggcagcc	5'FS -1284/-1267	PFKFB3 (glicólise)	H
ttcacGCGTGccgctgct	5'FS -433/-416	PFKFB4 (glicólise)	H
ccaaaCCGTGctgaccat	5'FS -146/-129	PEPCK (gliconeogênese)	R
cacagGCGTGccgtctga	5'FS +273/+290	Transportador de glicose 1 (importação de glicose)	C
ctgatGCGTGcagacgg	5'FS +300/+283	Transportador de glicose 1 (importação de glicose)	C
gctgtACGTGcattggaa	5'FS -9/-26	CAIX (regulação do pH)	H
tgttgACGTGggggcgg	5'FS -198/-215	GPx-3 (glutaciona peroxidase)	H
cagtcACGTGgggggaac	5'FS -2201/-2184	CYP4B1 (síntese de eicosanóide)	Co
ctcccACGTGgggtcagg	5'FS -835/-818	CYP3A6 (metabolismo de xenobióticos)	Co
ggggcACGTGagccacag	5'FS +749/+766	CYP2C11 (metabolismo de xenobióticos)	R
cagacACGTGtaaatgca	5'FS +967/+984	CYP2C11 (metabolismo de xenobióticos)	R
ccgggGCGTGggctgagc	5'FS 1020/1037	MDR1 (transportador de xenobióticos)	H

Crescimento celular e apoptose

caactACGTGctctggtt	IVS1 +669/+652	IGFBP-1 (fator de crescimento)	H
--------------------	----------------	--------------------------------	---

gcaggACGTGctctggga	IVS1 +710/+727	IGFBP-1 (fator de crescimento)	H
tgcccACGTGctggcaag	IVS1 +928/+911	IGFBP-1 (fator de crescimento)	H
aggacACGTGgagaggct	5'FS -6280/-6263	TGF- β 3 (desenvolvimento da placenta)	C
tcggaACGTGggccttgg	5'FS -5200/-5217	TGF- β 3 (desenvolvimento da placenta)	C
aggctGCGTGcgctggtc	5'FS -89/-72	TGF- β 3 (desenvolvimento da placenta)	H
tgtccACGTGggggcctg	5'UT +348/+331	Endoglin (co-receptor de TGF- β)	H
gtggaACGTGactcaag	5'FS -3736/-3753	CTGF (fator de crescimento do tecido conectivo)	H
tctttGCGTGgtgtgtg	5'FS -1549/-1566	CTGF (fator de crescimento do tecido conectivo)	H
ggagtACGTGggcctgtg	5'FS -133/-116	ITF (função da barreira intestinal)	H
aaaacCCGTGcctcgaat	5'FS -377/-360	CD73 (função da barreira intestinal)	H
gctgtACGTGagctccgg	5'FS +265/+248	ROR α 4 (receptor órfão relacionado ao RA)	C
tgcaACGTGcggccgggt	5'FS -450/-433	RTP801/REDD1 (crescimento celular)	C
cagggACGTGtccccagg	5'FS -1243/-1226	SDF-1 (quimiocina CXCL12)	H
gagggCGGTGcgctcgca	5'FS -1292/-1309	CXCR4 (receptor de quimiocina)	H
accccCGGTGcggtcacg	5'FS -220/-203	<i>Nur77</i> (receptor órfão de esteróide)	C
ctgcaCGGTGaccgcacg	5'FS -197/-214	<i>Nur77</i> (receptor órfão de esteróide)	C
agcgcCGGTGtggaagg	5'FS +142/+159	<i>met</i> (protooncogene)	H
agcgcCGGTGgtgtcct	5'FS +342/+359	<i>met</i> (protooncogene)	H
agagcACGTGcgggcca	5'FS -222/-205	<i>Wt1</i> (supressor de tumor Wilms)	C
ttcccACGTGgcgagggg	5'FS -169/-152	TERT (telomerase)	H
tgccACGTGggaagccc	5'UT +40/+57	TERT (telomerase)	H
gccgcACGTGcccacgc	5'FS -238/-221	NIP3 (pro-apoptótico)	HC
gccgcACGTGccacacgc	5'FS -250/-233	BNIP3 (pro-apoptótico)	H
tacagCGGTGagccaccg	5'FS -1288/-1271	Noxa (pro-apoptótico)	H
cagggCGGTGagggcg	5'FS -139/-122	PP5 (anti-apoptótico)	H
tacagCGGTGgccacca	5'FS?	? Mcl-1 (anti-apoptótico)	H
agaggACGTGgaagggt	5'FS -399/-382	Nucleofosmina (inibição da p53)	H

Outros

tgtgcCGGTGgtgccata	5'FS -1197/-1184	Cited2/p35srj (cofator transcricional)	H
acgggACGTGcagctacg	5'FS -1180/-1167	Cited2/p35srj (cofator transcricional)	H
cagctACGTGcccacctc	5'FS -1170/-1157	Cited2/p35srj (cofator transcricional)	H
cgaatCGGTGcgtgggtg	5'FS -729/-712	ID2 (repressor transcricional)	H
cacatACGTGccacagtg	5'FS -1884/-1891	ID2 (repressor transcricional)	H
acaggACGTGagggcatgt	5'FS -336/-353	ETS-1 (fator transcricional)	H
gccagACGTGcctggagt	5'FS -461/-444	DEC1 (fator transcricional)	H
agctcACGTGcggaaact	5'FS -297/-314	DEC2 (fator transcricional)	H
gacgcCGGTGccctgtgg	5'FS -277/-260	DEC2 (fator transcricional)	H
agagtACGTGctag????	5'FS -101/-114	Retrotransposon VL30	R
tggagACGTGcgcgtcct	5'FS -235/-218	H Herpesvirus 8 ORF34	V
ggttgACGTGccactaag	5'FS -321/-338	B19 eritrovirus	V
ACGTGaccagg	5'UT -5/+13	CD18 (adesão de leucócitos)	H
gggggACGTGaaaaagg	5'FS -707/-690	GRP94 (chaperona)	H
tggcaACGTGttctcac	5'FS -403/-420	GRP94 (chaperona)	H
gtcccACGTGtgaggggc	5'FS -253/-236	GRP94 (chaperona)	H
accggCGGTGgtggctca	5'FS -868/-851	Furina (proteína convertase)	H
tggggACGTGgttgttt	5'FS -121/-138	MT1 (metaloproteinase da matriz)	H
tcgctACGTGcgctcagt	5'FS -75/-92	Colágeno prolil 4-hidroxilase (I)	R
ggtgtACGTGcagagcgc	5'FS -417/-400	PHD2 (sensor de O ₂)	H
gggctACGTGcgctcgt	IVS1 +12583/+12600	PHD3 (sensor de O ₂)	H

HIF-1 se liga aos genes alvos em sítios contendo o centro de reconhecimento 5'-RCGTG-3' (Semenza, 1996). A presença dos sítios de ligação do HIF-1 (HBS) é necessária, mas não suficiente para a expressão dos genes em resposta à hipóxia, indicando que o HIF-1 deve interagir com outros fatores de transcrição ligados a sítios adjacentes (Elbert e Bunn, 1998). Além disso, foram descobertas outras proteínas que interagem com HIF-1 α , tais como os coativadores CBP, p300 e HNF4 e as proteínas Hsp90, p53, dentre outros (Semenza, 2001). A tabela 2 mostra as proteínas que interagem com o HIF-1 α (Wenger *et al.*, 2005).

Tabela 2. Proteínas que interagem com o HIF-1 α . Relação das proteínas que interagem com o HIF-1 α para regular sua estabilidade ou sua atividade transcricional. A regulação do HIF-1 α se dá por modificações covalentes tais como hidroxilação, ubiquitinação, acetilação, fosforilação ou pela proteção estérica da modificação/ degradação. Um outro grupo de proteínas que interagem com o HIF-1 α são os cofatores transcricionais que aumentam a transcrição gênica, geralmente de uma maneira gene específica. Fonte: Wenger *et al.* (2005) (modificado).

Proteínas envolvidas nas modificações pós-transcricionais do HIF-1 α e sua estabilidade

PHD1/HPH3	Hidroxilação de prolina
PHD2/HPH2	Hidroxilação de prolina
PHD3/HPH1	Hidroxilação de prolina
FIH	Hidroxilação de asparagina
VHL	Ubiquitinação
VLP	Homólogo do VHL negativo dominante
VDU2	Deubiquitinação
ARD1	Acetilação
PSMA7	Degradação pelo proteasoma
p42/p44 ERK	Fosforilação
GSK-3	Fosforilação
DNA-PKcs, Ku70 e Ku80	Fosforilação

Proteínas envolvidas na estabilidade do HIF-1 α

HSP90	Enovelamento/estabilidade
HSP70	Enovelamento/estabilidade
p53	Estabilidade da proteína
Mdm2	Estabilidade da proteína
Jab1/CSN5	Estabilidade da proteína
SUMO-1	Estabilidade da proteína?/atividade transcricional?
OS-9	Estabilidade da proteína
Per1	Estabilidade da proteína
ER α	Estabilidade da proteína

Cofatores transcricionais do HIF-1 α

ARNT	Heterodimerização
------	-------------------

CBP/p300	Histona acetiltransferases; coativadores
SRC-1	Histona acetiltransferases; via CBP
TIF2	Histona acetiltransferases
HDAC7	Histona deacetilase; coativadora
HDAC1, 2, 3	Histona deacetilases; via VHL e FIH
Ref-1	Redução de cisteína (regulação do estado redox)
HNF4	Gene alvo-específico
Smad3	Gene alvo-específico
STAT3	Gene alvo-específico
C/EBP α	Gene alvo-específico
Ets-1	Gene alvo-específico; Flk-1; HIF-2 α -específico
Myc	Neutralizado pelo HIF-1 α
p14ARF	Sequestro nucleolar
HBx	Recrutamento de CBP
Brm	Remodelamento da cromatina
Brg-1	Remodelamento da cromatina
TRIP230	Interage com ARNT; coativador
pRB	Ativador de HIF
NEMO	HIF2- α -específico

A identificação de genes alvos do HIF-1 tem sido feita usando-se várias estratégias, incluindo: (1) identificação de genes que contêm os motivos de ligação do HIF (HREs); (2) comparação dos padrões de expressão gênica entre células tipo-selvagem para a expressão do HIF-1 α com células que não expressam essa proteína ou ainda através de técnicas de RNA de interferência (RNAi); (3) varredura dos níveis aumentados de expressão gênica usando células que não expressam VHL ou células transfectadas com vetores que expressam a subunidade HIF-1 α . Os genes transcricionalmente ativados pelo HIF-1 participam de diversos processos celulares e codificam proteínas que residem em diferentes compartimentos celulares (por exemplo, fatores transcricionais nucleares, proteínas ligadas à membrana, proteínas citossólicas e fatores de crescimento secretados) (Bracken *et al.*, 2003; Semenza, 2003).

Sob condições severas de hipóxia, a geração de ATP a partir da fosforilação oxidativa é substituída pela geração menos eficiente de ATP através da glicólise anaeróbica. Dessa forma, o fornecimento de ATP para a síntese de proteínas pode cair até 7% em relação às células expostas a condições de normóxia. Para compensar o decréscimo de ATP normalmente fornecido pela fosforilação oxidativa, HIF-1 ativa genes-chaves envolvidos no transporte de glicose e glicólise, tais como o transportador 1 e 3 de glicose (GLUT-1 e 3), fosfofrutoquinase L (PFK),

fosfoglicerato quinase 1 (PGK1) e lactato desidrogenase-A (LDH) (Bracken *et al.*, 2003; Semenza, 2003). Muitos fatores pró-angiogênicos tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformante $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$), receptor do VEGF, (conhecido também como Flt-1), fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-b) são induzidos por HIF-1 para promover a formação de vasos. Outros genes ativados pelo HIF-1 incluem fatores que regulam a proliferação e sobrevivência celular, apoptose, motilidade e estrutura do citoesqueleto, metabolismo da matriz extracelular, tônus vascular, metabolismo de nucleotídeos, adipogênese, desenvolvimento de células B e resistência a drogas. Fatores de transcrição como AP-1, CREB, GATA-1 e GATA-2 são também alvos do HIF-1 e que posteriormente regulam uma variedade de genes que promovem a diferenciação e sobrevivência celular (Semenza, 2003). Enquanto HIF-1 permanece como o regulador predominante da expressão gênica durante a hipóxia, existem dados que mostram mecanismos da regulação transcricional em resposta ao oxigênio independente do HIF-1. Por exemplo, NF- κ B e AP-1 induzem a expressão de um conjunto de genes tais como, citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina β (IL- β), endotelina e fator de crescimento B derivado de plaquetas sob condições de hipóxia (Bandyopadhyay *et al.*, 1995).

7. Envolvimento do HIF-1 na apoptose e resposta adaptativa

Apoptose, também chamada de morte celular programada, é crítica não somente durante o desenvolvimento e homeostase dos organismos, mas também na patogênese de uma variedade de doenças humanas, incluindo câncer, doenças auto-imunes, infecções virais e desordens neurodegenerativas (Inohara *et al.*, 1997). A iniciação da apoptose em eucariotos superiores é um processo altamente coordenado e regulado. Em metazoários ela pode ser induzida ou suprimida por vários sinais envolvendo interações entre moléculas extracelulares e vias intracelulares de transdução de sinal. Várias moléculas intracelulares participam nos processos de salvamento ou suicídio da célula. Dentre as proteínas que participam no processo de salvamento podemos citar as proteínas da família Bcl-2 (Bcl-2 e Bcl-x_L). Outros membros da família Bcl-2, tais como, Bax, Bak e Bid atuam induzindo a

apoptose. Enzimas proteolíticas chamadas caspases (ou proteases ICE – enzima conversora de interleucina 1 β), a proteína p53 e o citocromo c (quando presente no citoplasma) também estão envolvidos no suicídio da célula (Raff, 1998). Em mamíferos, Bcl-2 parece inativar Bax pela formação de um heterodímero Bcl-2/Bax (Jürgensmeier *et al.*, 1997). O efeito anti-apoptótico de Bcl-2 parece ser, parcialmente, devido às suas propriedades antioxidantes (Kane *et al.*, 1993).

HIF-1, centralmente envolvido na manutenção da homeostase fisiológica de oxigênio, também é ativado na maioria dos tumores. A ativação do HIF-1 ocorre como resultado da hipóxia dentro de tumores sólidos. O HIF-1 afeta o padrão de expressão gênica e crescimento tumoral, embora efeitos variem entre tipos diferentes de tumores. A hipóxia microambiental que aumenta em consequência do desenvolvimento de um tumor sólido age para promover o crescimento do tumor. A hipóxia induz a expressão de componentes chaves das cascatas de sinalização angiogênica e apoptótica, da via glicolítica e várias proteínas do controle do ciclo celular (Knowles e Harris, 2001).

A hipóxia é capaz de suprimir os efeitos apoptóticos da falta de soro em células endoteliais e tumorais através da indução de VEGF (Gupta *et al.*, 2000). A hipóxia em células HepG2 inibe a apoptose, reduz a taxa bax:bcl2, diminui a liberação de citocromo c para o citoplasma e a atividade de caspase 3. Estes efeitos são bloqueados pelo anticorpo anti-VEGF ou inibidores de sinalização de receptores tirosina quinase. Células-tronco embrionárias deficientes na expressão de HIF-1 α foram geradas para estudar o efeito de HIF-1 em tumores sólidos (Carmeliet *et al.*, 1998). Estas células foram injetadas subcutaneamente em camundongos que não expressam HIF-1 α (*null*) e observou-se uma menor formação do sistema vascular em tumores que não expressavam HIF-1 α , quando comparados com tumores onde HIF-1 α recombinante foi introduzido e se expressava normalmente. Observou-se que a proliferação celular foi comparável nos dois tumores com duas semanas de crescimento, mas foi significativamente maior em tumores que não expressavam HIF-1 α no período de 4 a 7 semanas. Em tumores que expressavam HIF-1 α recombinante a proliferação celular foi mínima sob condições de hipóxia. No entanto, em tumores que não expressavam HIF-1 α , a hipóxia estimulou a proliferação. A perda de HIF-1 α afetou o crescimento dos tumores pela progressão seletiva de células que proliferavam intensamente, como ocorre na ausência de p53. A

apoptose foi consistentemente menor em tumores que não expressavam HIF-1 α do que em tumores que expressavam HIF-1 α recombinante. Neste caso o sistema HIF-1 α afeta o crescimento dos tumores induzindo a apoptose em suas células constituintes (Carmeliet *et al.*, 1998).

Em linhagens de células de mamíferos, a atividade de HIF-1 α pode ser induzida por hipóxia, cloreto de cobalto (CoCl₂) (Ho e Bunn, 1996), desferrioxamina (Woo *et al.*, 2006), alterações no estado redox celular (Yang *et al.*, 2003) e fosforilação do HIF-1 α (Mylonis *et al.*, 2006, Kwon *et al.*, 2005). Quando as células são expostas à hipóxia severa, o mecanismo de proteção adaptativa iniciado pelo HIF-1 não é suficiente, resultando em apoptose celular. Surpreendentemente, HIF-1 parece estar envolvido tanto na iniciação da apoptose quanto na iniciação de uma resposta adaptativa. Assim, hipóxia e mais especificamente o HIF-1 α exercem efeitos pro- ou anti-apoptóticos. Pelo menos dois mecanismos podem explicar o papel do HIF-1 na indução da apoptose. Primeiro, foi verificado sob condições de hipóxia o aumento da expressão de Nip3, uma proteína pro-apoptótica membro da família Bcl2. Isso não ocorre em células deficientes em HIF-1 α . Foi verificado também que Nip3 é constitutivamente expressa sob condições de normóxia em células que não expressam o fator VHL e portanto não degradam o HIF-1 α (Sowter *et al.*, 2001). Bruick (2000) demonstrou a presença de um HRE funcional no promotor de Nip3. O segundo mecanismo pode se dar pela hipóxia mais prolongada ou mais severa e resulta da associação do HIF-1 α na forma defosforilada com a proteína p53 (Suzuki *et al.*, 2001). Sob condições de hipóxia a proteína p53, um potente fator de transcrição, se torna estável e pode ativar genes alvos que iniciam a morte celular, como por exemplo a proteína Bax. Por outro lado, os efeitos anti-apoptóticos são evidenciados em níveis de hipóxia que levam à ativação do HIF-1 α (forma fosforilada) via dimerização desta molécula com ARNT e aumento adaptativo na transcrição gênica (Piret *et al.*, 2002). Esses mecanismos propostos por Piret *et al.* (2002) estão ilustrados na Figura 6.

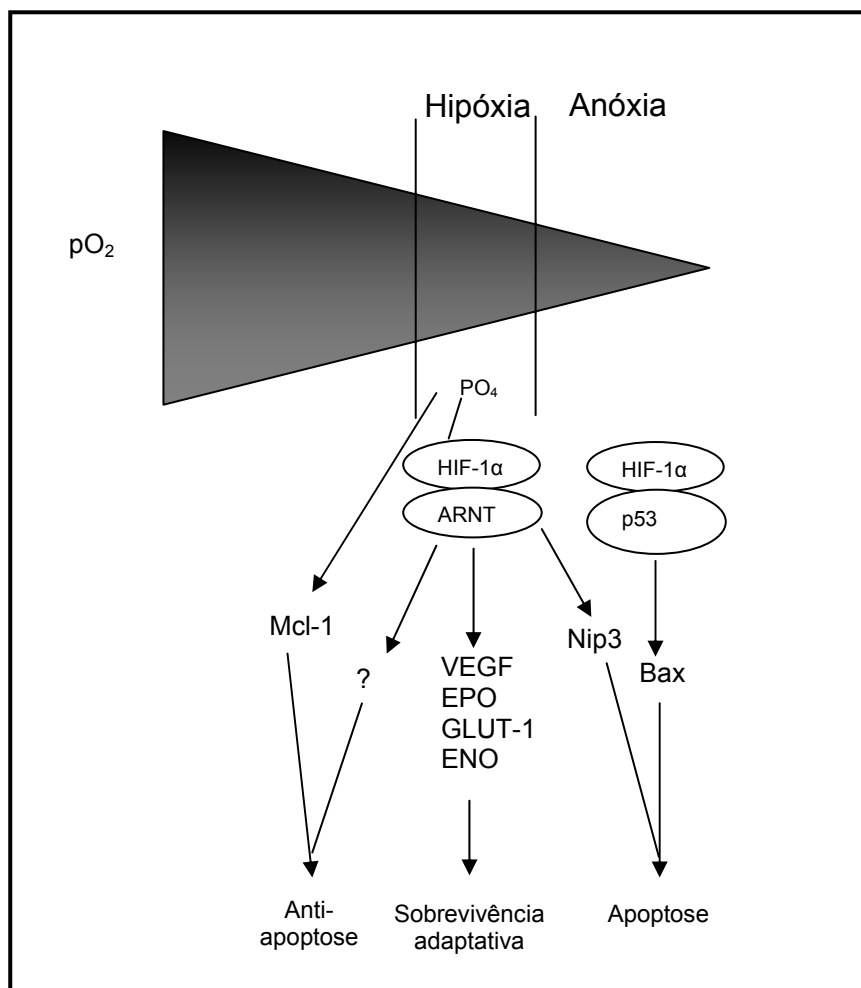


Figura 6. Representação esquemática dos efeitos pro- e anti-apoptóticos do HIF-1. Modelo proposto por Piret *et al.* (2002).

8. Estresse oxidativo

Para a maioria dos organismos na terra, a vida seria impossível sem o oxigênio (O_2). Animais e uma considerável parte de microrganismos dependem de oxigênio para uma produção eficiente de energia na forma de ATP. Com a evolução das cianobactérias, há mais de 2,5 bilhões de anos atrás, e seguindo o advento da fotossíntese, mudanças consideráveis ocorreram na atmosfera primitiva, predominantemente redutora (rica em H_2) ou neutra (CO_2 e N_2) que se tornou mais e mais oxidativa (Gille e Sigler, 1995). Todos os organismos aeróbicos podem estar expostos ao estresse oxidativo, causado por espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas espécies são formadas durante o metabolismo normal da célula, quando

ocorrem mudanças na tensão de oxigênio (Steels *et al.*, 1994) ou pela redução incompleta do oxigênio molecular até a água na cadeia transportadora de elétrons (CTE). EROs também podem ser formadas pela exposição das células à radiação ionizante, químicos do ciclo redox presentes no ambiente ou exposição a metais pesados (Jamieson, 1998). Através destes mecanismos, todos os organismos aeróbicos são continuamente expostos a oxidantes reativos e o estresse oxidativo ocorre quando a concentração destes oxidantes aumenta além da capacidade de tamponamento da célula. Dado a natureza ubíqua das EROs, não é surpreendente que a maioria (se não todos) os organismos tenham desenvolvido uma maneira de proteger seus componentes celulares contra oxidantes reativos (Jamieson, 1998).

O oxigênio molecular (O_2), uma molécula relativamente não reativa e inofensiva em seu estado basal, é capaz de sofrer excitação ou redução parcial para formas altamente reativas, que incluem o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos de lipídios. Essas espécies reativas são capazes de danificar constituintes celulares tais como o DNA, lipídios e proteínas (Turton *et al.*, 1997). Fosfolipídios de membranas são particularmente susceptíveis ao ataque de radicais livres derivados do oxigênio, devido à abundância de ácidos graxos polinsaturados (AGPI) e à alta solubilidade do oxigênio molecular em membranas (Steels *et al.*, 1994). Consequentemente todas as células vivas estão sujeitas a condições de estresse e mostram respostas moleculares a essas condições adversas (Mager e Ferreira, 1993).

EROs são formadas em qualquer organismo exposto ao oxigênio molecular e parecem ter papel crucial na apoptose (Ghibelli *et al.*, 1995). As mitocôndrias são as maiores fontes de produção de radical superóxido. Durante a transferência de elétrons para o oxigênio molecular, 1 a 5 % do O_2 consumido na CTE mitocondrial participa na formação de $O_2^{\bullet-}$. Qualquer fator que diminua a eficiência de acoplamento dos elétrons à CTE mitocondrial pode, portanto, aumentar a produção de radicais superóxidos (Green e Reed, 1998). Os níveis de radicais superóxidos e de peroxidação lipídica aumentam durante a apoptose induzida por vários estímulos. No entanto, a geração de EROs em alguns casos, pode ser um evento relativamente tardio, ocorrendo após as células terem iniciado o processo de ativação de caspases (Green e Reed, 1998). Com essas considerações, foi sugerido que pelo menos algum estímulo apoptótico funciona em condições de anóxia ou hipóxia, implicando

que a formação de EROs não é um evento “sine qua non” de apoptose. No entanto, EROs podem ser gerados sob condições de anaerobiose praticamente total, e assim suas funções na apoptose não podem ser excluídas somente com essas considerações (Green e Reed, 1998).

8.1. Papel do estresse oxidativo na regulação do HIF-1

Embora o HIF-1 tenha sido inicialmente descrito como o fator de transcrição regulado pela hipóxia, existem agora crescentes evidências de que o HIF-1 é também responsivo a uma variedade de estímulos não hipóxicos. Entre esses estímulos podemos citar a insulina (hormônio) (Zelzer *et al.*, 1998), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- β e IGF-1 (fatores de crescimento) (Richard *et al.*, 2000; Fukuda *et al.*, 2002), trombina (fator de coagulação) (Görlach *et al.*, 2001), peptídeos vasoativos tais como angiotensina II (Richard *et al.*, 2000), citocinas (Stiehl *et al.*, 2002), ou carbacol que ativa os receptores de acetilcolina muscarínicos (Hirota *et al.*, 2004). Além disso, foi mostrado que o HIF-1 é ativado por metais tais como, cobalto, cromo, níquel e arsênio (Duyndam *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2002) como também por estresse mecânico (Kim *et al.*, 2002). Sabe-se que quando o íon ferro é quelado, por exemplo, pela ciclopirox oalamina (CPX), os níveis de HIF-1 α aumentam significativamente em células do corpo carótido de ratos, já que o ferro é um cofator para as HPHs (Baby *et al.*, 2003). Assim, o HIF-1 α não é alvo de hidroxilação pelas HPHs e não é então, levado à degradação. No entanto, os mecanismos pelos quais esses estímulos não hipóxicos induzem o HIF-1 não são completamente conhecidos, embora algumas evidências apontam para o papel dos EROs como mensageiros regulando a atividade do HIF-1. Os estímulos não hipóxicos que levam à indução do HIF-1 estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Estímulos que induzem a expressão do HIF-1 α , sua ativação ou ambas, independentemente de condições de hipóxia. Fonte: Wenger *et al.* (2005).

Proteínas

Insulina, IGF-1, IGF-2, bFGF, EGF, HGF, PDGF, TGF- β , II-1 β , TNF- α , Angiotensina II, Endotelina-1, Thrombina, Heregulina, Nur77, Antígenos (receptor de células T)

Moléculas pequenas

Andrógenos, hormônio tireoidiano, Acetilcolina, FSH, Serotonina, NO, EROs (células *junD*^{-/-}), LPS

Infecção viral

Vírus Epstein-Barr, Vírus da Hepatite B, Vírus da Herpes

Estímulo físico

Calor, Estresse mecânico

Íons

Fe³⁺ quelado, Co²⁺, Ni²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, As+III, Cr+VI, H+ (pH)

8.2. EROs como moléculas sinalizadoras

Em células de mamíferos EROs podem ser formados em resposta a agentes tóxicos ou como produtos de enzimas que utilizam o O₂ tais como, enzimas da cadeia transportadora de elétrons, via do ácido aracdônico, a família das citocromo P450, glicose oxidase, aminoácido oxidases, xantina oxidase, NADH/NADPH oxidases ou NO sintases (Finkel, 2001, Cai e Harrison, 2000). A transferência de um elétron para o O₂ resulta na produção do radical superóxido (O₂^{•-}) que pode levar à formação de outros EROs tais como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxil ([•]OH), peroxinitrito (ONOO⁻), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio singlete (¹O₂). Sob condições fisiológicas normais, a formação de EROs é contrabalançada pelos sistemas de defesa antioxidantes endógenos tais como superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase, peroxiredoxinas, tioredoxinas e antioxidantes de baixa massa molecular.

A redução da expressão dos genes alvos do HIF-1 quando células são tratadas com agentes oxidantes sob condições de hipóxia sugere que o HIF-1 é sensível ao estado redox. A primeira evidência veio de experimentos onde o HIF-1 purificado foi tratado com H₂O₂ e com diamina (agente oxidante) os quais aboliram a capacidade ligante do HIF-1 ao DNA. Além disso, foi observado que a alquilação dos grupos sulfidril livres leva à perda da atividade ligante do HIF-1 ao DNA. Esse efeito foi evitado quando o agente redutor ditiotreitól foi adicionado previamente ao sistema

oxidativo (Wang *et al.*, 1995a), sugerindo que HIF-1 requer condições redutoras para exercer sua atividade ligante. De fato, o fator 1 redox (Ref-1), uma proteína com função de endonuclease e proteína regulatória do estado redox e seu regulador, a tioredoxina (Trx), aumentam a atividade e níveis de proteínas do HIF-1 sob condições de normóxia e hipóxia, respectivamente (Huang *et al.*, 1996; Welsh *et al.*, 2002). Ref-1 se liga aos domínios TAD-N e TAD-C do HIF-1 α com um efeito predominante no TAD-C (Ema *et al.*, 1999; Carrero *et al.*, 2000). Dentro desse domínio, os estados de oxidação/redução da cisteína 800 no HIF-1 α e cisteína 848 no HIF-2 α são críticos para a transativação e recrutamento do CBP/p300, SRC-1 e Tie-2 (Huang *et al.*, 1996; Carrero *et al.*, 2000). Evidências adicionais de que o H₂O₂ e outros EROs exercem um papel importante na regulação do HIF-1 vieram de experimentos onde células Hep3B crescidas sob condições de hipóxia e tratadas com H₂O₂ apresentam uma desestabilização do HIF-1 α (Huang *et al.*, 1996). O mesmo foi observado em células HeLa com relação ao HIF-2 α (Wiesener *et al.*, 1998).

Vários mecanismos têm sido postulados para explicar a participação da CTE mitocondrial na estabilização do HIF-1 α (Chandel *et al.*, 2000). Uma grande questão que se tem levantado a esse respeito é a de como a geração de EROs mitocondrial está ligada à estabilização do HIF-1 α . Estudos mostraram que a ativação das vias envolvendo Rac, Rho, c-Src e p38 MAPK sob condições de hipóxia é prevenida por antioxidantes ou inibidores da CTE (Wang *et al.*, 1995b). Além disso, estratégias genéticas que diminuem Rac, Rho, Src e p38a MAPK previnem a estabilização do HIF-1 α sob condições de hipóxia (Bell *et al.*, 2005). Bell *et al.* (2005) propuseram um modelo onde a hipóxia estimula a produção de radicais superóxidos pela CTE mitocondrial os quais são liberados dentro do citosol e convertidos a H₂O₂. O aumento de H₂O₂ potencialmente resultaria em uma ativação da p38 MAPK dependente de Src-Rac. Nesse caso, essa ativação preveniria a hidroxilação do HIF-1 α pela inibição das prolil hidroxilases, permitindo que o HIF-1 α não seja degradado pela via VHL/proteassoma.

9. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae é um eucarioto unicelular conhecido também como levedura de padeiro (baker's yeast). Leveduras têm similaridades marcantes com células de mamíferos em níveis de macromoléculas e de organelas. Tem sido mostrado que um grande número de proteínas de leveduras possuem funcionalidade altamente conservada com proteínas homólogas humanas. Assim, é valioso o uso de leveduras como sistema modelo que tem dado uma contribuição relevante para o entendimento de diversos mecanismos moleculares em células humanas. O envolvimento do estresse oxidativo no envelhecimento, apoptose e um número significativo de doenças levou à caracterização dos sistemas antioxidantes e à elucidação de seu papel fisiológico. Estudos usando leveduras têm contribuído para elucidar o papel das espécies reativas de oxigênio em doenças relacionadas ao estresse oxidativo, tais como esclerose lateral amiotrófica (ALS) e ataxia de Friedreich (FRDA) (Costa e Moradas-Ferreira, 2001).

A esclerose lateral amiotrófica é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela degeneração seletiva dos neurônios motores. Foi verificado que mutações na enzima antioxidante superóxido dismutase contendo cobre e zinco (CuZnSOD) participa no desenvolvimento da esclerose lateral amiotrófica familiar (FALS). A ataxia de Friedreich é uma doença neurodegenerativa hereditária que afeta o sistema nervoso e o coração. É caracterizada pela deposição de ferro, deficiência em enzimas mitocondriais e hipersensibilidade ao estresse oxidativo. Essa doença resulta de uma deficiência em frataxina, uma proteína mitocondrial, codificada no genoma nuclear. Os estudos com o homólogo da frataxina em leveduras (Yfh1p) sugerem que esta proteína é um ligante de ferro que exerce um papel chave na regulação da homeostase de ferro e resistência ao estresse oxidativo. A ruptura do gene *YFH1* causa um acúmulo de ferro na mitocôndria, níveis aumentados de EROs e perda da função mitocondrial devido a mutações no DNA mitocondrial (Costa e Moradas-Ferreira, 2001). Isto exemplifica como estudos com leveduras ajudam a desvendar a função de proteínas humanas.

Em leveduras, assim como em bactérias e células de mamíferos, variações nos níveis de oxigênio podem levar a uma resposta celular. Os mecanismos envolvidos na sensibilidade ao oxigênio e sinalização intracelular são melhor elucidados em procariotos. Apesar do entendimento da regulação transcricional dos

genes responsivos ao oxigênio em células eucarióticas ter aumentado nos últimos anos, muitos aspectos necessitam a ser explicados. *S. cerevisiae* é um sistema modelo ideal para se responder essas questões. As células da levedura *S. cerevisiae* são anaeróbicas facultativas, que respiram na presença de oxigênio, mas fermentam sob condições de anaerobiose. Vários genes são diferencialmente expressos quando as células de leveduras são expostas a diferentes concentrações de oxigênio, permitindo que estas regulem eficientemente o metabolismo celular nas de respiração e fermentação (Zitomer e Lowry, 1992).

Os genes em *S. cerevisiae* que respondem às mudanças nas tensões de oxigênio são classificados basicamente em duas categorias: genes aeróbicos: genes que são constitutivamente expressos sob condições normais de aeração, mas são reprimidos quando as células são submetidas a baixos níveis de oxigênio. A outra classe são os genes hipóxicos, que são reprimidos sob condições normais de oxigênio e são induzidos sob baixos níveis de oxigênio. Foi mostrado que as expressões de muitas proteínas de *S. cerevisiae* são afetadas por diferentes níveis de oxigênio. Dentre essas proteínas podemos citar, proteínas envolvidas na cadeia respiratória, na síntese de heme, na captação de esteróis e metabolismo de ácidos graxos insaturados (Burke *et al.*, 1997; Kwast *et al.*, 1999; Alimardani *et al.*, 2004; Vasconcelles *et al.*, 2001; Poyton e Burke, 1992).

ter Linde e colaboradores (1999) descreveram as análises do genoma transcricional de células de *S. cerevisiae* crescidas em quimiostato em condições aeróbicas e anaeróbicas baseados em resultados de Northern blot. Eles encontraram que 5.739 (93%) das 6.171 ORFs (*open reading frames*) foram transcritas em níveis detectáveis e similares sob ambas condições. Aproximadamente 4% (219) do total dos genes analisados apresentou um aumento na transcrição em mais de 3 vezes sob condições aeróbicas e aproximadamente 2,5% (140 genes) apresentou um aumento na transcrição em mais de 3 vezes sob condições anaeróbicas, a maioria deles com função desconhecida. Poucos genes apresentaram indução maior que 10 vezes.

Os efeitos do oxigênio nas concentrações intracelulares de muitas proteínas são exercidos através da transcrição de seus respectivos genes. Por exemplo, *ANB1* tem sua expressão aumentada em condições anaeróbicas (Zitomer e Lowry, 1992), assim como *AAC3* (Sabová *et al.*, 1993), que codifica uma proteína envolvida na expressão do translocador ATP/ADP mitocondrial. *HEM13*, uma proteína que

participa no metabolismo do heme (Amillet *et al.*, 1996), e *OLE1*, gene que codifica a enzima $\Delta 9$ ácido graxo desaturase (Vasconcelles *et al.*, 2001), importante na síntese de ácido graxos insaturados (ex: ácidos palmitoleico e oléico), também mostram níveis aumentados de expressão sob condições anaeróbicas. Foi descrito que não apenas a hipóxia, mas também o cobalto e o ferro podem levar à expressão de *OLE1* em células de leveduras. Um estudo da estrutura do gene *OLE1* revelou a presença de um elemento de resposta a baixos níveis de oxigênio (LORE), o qual foi também identificado em outros genes de levedura, tais como *ATF1*, *TRX2*, *SUT1*, *TIR1*, *FTR1*, *MET22*, *FKH1* e *RPL35A*. Usando oligonucleotídeos correspondentes ao motivo LORE e extratos de células de leveduras submetidas a baixas tensões de oxigênio, os autores demonstraram atividade ligante de proteínas endógenas à essa seqüência de DNA. No entanto, através de uma análise de Northern Blot usando RNA de células submetidas a hipóxia, foi verificado apenas a indução significativa dos genes *ATF1*, *TRX2* e *SUT1*. Os níveis de mRNA do gene *RPL35A* não mudaram e do gene *FTR1* tiveram uma redução (Vasconcelles *et al.*, 2001).

Embora a seqüência do motivo LORE (ACTCAACAA) presente em *S. cerevisiae*, seja funcionalmente similar ao elemento responsivo à hipóxia-HRE (BRCGTGVBBB) presente em genes de mamíferos, uma análise dessas seqüências mostrou que não há similaridade significativa entre esses dois motivos (Vasconcelles *et al.*, 2001). Apesar disso e do fato de que leveduras não codificam o HIF-1, não está claro se existe uma proteína funcionalmente homóloga que ative genes hipóxicos de leveduras.

É sabido que a ativação de genes hipóxicos em células de leveduras e de mamíferos ocorrem em diferentes concentrações de oxigênio; 0,2% O₂ em leveduras (Kwast *et al.*, 1999; Emerling e Chandel, 2005) e 0,5% a 5% O₂ em células de mamíferos (Jiang *et al.*, 1996). Muitos dos genes induzidos em condições de hipóxia e anóxia em células de mamíferos são regulados pelo fator de transcrição HIF-1 e HIF-2, mas ainda não está claro como a hipóxia é detectada por um sensor de oxigênio para ativar genes regulados por HIF-1. A estabilização e ativação do gene HIF-1 α começa quando a concentração de oxigênio alcança aproximadamente 5% com aumento da atividade desse fator de transcrição quando os níveis de oxigênio caem ainda mais. Sob hipóxia, vários genes são induzidos, muitos deles participam nas vias de sobrevivência celular e pro-angiogênica as quais capacitam as células a recuperarem os níveis de O₂. Diferentemente, *S. cerevisiae* é um eucarioto

unicelular anaeróbico facultativo, sendo capaz de sobreviver sob total ausência de oxigênio.

10. Contextura dos tópicos do trabalho

A seqüência de eventos que leva à ativação do HIF-1 α e aos efeitos paradoxais (atuando como fator pro- e anti-apoptótico) do HIF-1 não é completamente entendida. Nem está claro como os mecanismos dependentes e independentes de oxigênio contribuem para as modificações pós-traducionais do HIF-1 α , sua translocação para o núcleo, sua heterodimerização com o ARNT, ligação ao DNA nas regiões regulatórias de genes alvos e recrutamento de cofatores. Recentemente, Chachami *et al.* (2005) demonstraram que o HIF-1 α e ARNT humanos são capazes de formar o heterodímero e se ligar ao DNA quando co-expressos em bactéria, a qual não é capaz de inserir as modificações pós-traducionais normalmente introduzidas na proteína HIF-1 α . Esses resultados indicam que as modificações pós-traducionais são importantes, mas não necessárias para a heterodimerização e ligação do HIF-1 ao DNA. Essas modificações devem ser requeridas para processos mais tardios na cascata de sinalização.

Embora *Escherichia coli* ainda seja a principal escolha para a produção de proteínas heterólogas, a levedura *S. cerevisiae* tem outras características mais atrativas. Em contraste à *E. coli*, os mecanismos de modificações pós-traducionais disponíveis em leveduras têm permitido a expressão de várias proteínas humanas ou proteínas de patógenos humanos, com modificações adequadas. Por exemplo, a levedura *S. cerevisiae* está sendo usada para investigar a função detalhada de fatores de transcrição e receptores nucleares humanos, tais como o complexo Ahr/ARNT (Miller, 1997) e o fator A ativador transcricional mitocondrial humano (Parisi *et al.*, 1993). Miller (1997) mostrou que receptor de aril hidrocarbono e ARNT co-expressos em *S. cerevisiae* são capazes de formar o heterodímero e induzir a expressão de um gene repórter.

Membros da família bHLH-PAS com alta homologia ao HIF-1 α humano têm sido clonados de alguns organismos, incluindo camundongo, rato, esquilo, chimpanzé, coelho, rato-calunga da tundra, *Xenopus*, *Drosophila* e varias espécies de peixes (fonte: GenBank). O papel do HIF-1 na resposta de peixes à hipóxia está

começando a emergir. Além disso, o mRNA de HIF-1 α da truta arco-íris é constitutivamente expresso e não mostra mudança de expressão durante a exposição da truta por duas horas à hipóxia (Soitamo *et al.*, 2001). Rees *et al.* (2001) encontraram um potencial HRE no gene da enzima lactato desidrogenase-B (LDH-B) do peixe *Fundulus heteroclitus* e verificaram que a atividade dessa enzima aumenta duas vezes quando esse peixe é exposto à hipóxia. Até o momento não existe nenhum registro da presença do HIF-1 em organismos unicelulares.

A levedura *S. cerevisiae*, um eucarioto unicelular, é um organismo anaeróbico facultativo que respira na presença de oxigênio, mas fermenta sob condições de anaerobiose. Muitos genes variam sua expressão quando células são submetidas a diferentes concentrações de oxigênio, os quais permitem às células regular eficientemente o metabolismo para uma das duas vias alternativas produtoras de energia (Zitomer and Lowry, 1992). Em *S. cerevisiae*, a seqüência consenso chamada de LORE (elemento responsivo à baixa oxigênio; 5'-ACTCAACAA-3') controla a expressão de alguns genes sob condições de hipóxia e tem sido até agora identificado e caracterizado na região promotora do gene *OLE1* que codifica para a enzima Δ^9 ácido graxo desaturase (Vasconcelles *et al.*, 2001). O motivo LORE, embora funcionalmente similar ao HRE de genes de mamíferos, difere em termos de seqüência (Vasconcelles *et al.*, 2001). A existência de HRE em leveduras nunca havia sido descrita anteriormente até o presente trabalho.

Células de leveduras compartilham muitos processos bioquímicos com os organismos multicelulares, tais como respostas transcricionais e celulares, e introdução de modificações pós-traducionais. Além disso, são fáceis de manipular sob diferentes condições de laboratório. Nossos modelos de estudo são linhagens de *S. cerevisiae* deficientes na enzima antioxidante, superóxido dismutase (SOD). Existem diferentes isoenzimas de SOD em eucariotos. Dentre elas destacam-se a superóxido dismutase contendo cobre/zinco (CuZnSOD, produto do gene *SOD1*) de localização citoplasmática e superóxido dismutase contendo manganês (MnSOD, produto do gene *SOD2*) que se localiza na mitocôndria. Neste trabalho descrevemos a clonagem e expressão das duas subunidades do HIF-1 humano na levedura *S. cerevisiae* (linhagem EG103, tipo selvagem) e a expressão do HIF-1 α nas linhagens EG118 (não expressa a enzima CuZnSOD, também chamada SOD1) e EG110 (não expressa a enzima MnSOD, também chamada SOD2). O experimento

que demonstra a atividade de ligação ao DNA do HIF-1 humano expresso em leveduras será também descrito.

Apesar do crescente entendimento na regulação transcricional de genes responsivos ao oxigênio em células eucarióticas nos últimos anos, muitos aspectos ainda precisam ser explicados, incluindo aqueles referentes ao mecanismo sensor de oxigênio. Alguns aspectos desse mecanismo podem ser elucidados através de estudos em leveduras, já que esse mecanismo parece ser altamente conservado entre eucariotos (Vasconcelles et al., 2001). O presente trabalho propõe que a *S. cerevisiae* possui um análogo ao HIF-1, porque através de ensaios de EMSA (ensaio de mudança de mobilidade eletroforética) usando o oligonucleotídeo dupla-fita W18 que contém o HRE derivado do *enhancer* do gene da eritropoietina humana, a atividade de ligação ao DNA foi observada sob condições de hipóxia. Pretendemos também nesse trabalho, procurar possíveis motivos HREs no genoma de levedura utilizando ferramentas de bioinformática. Descrevemos os HREs em potencial encontrados nas regiões regulatórias dos genes de *S. cerevisiae* usando as ferramentas de bioinformática disponíveis RSAT e TRANSFAC. Também demonstramos que alguns genes de leveduras possuem *clusters* de HRE. Baseado nesses dados é provável que *S. cerevisiae* tenha um fator de transcrição que age através de HRE e, portanto é um análogo funcional do HIF-1 humano.

II. Objetivos Gerais

O objetivo desse trabalho foi obter leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas com moléculas recombinantes para possibilitar a expressão conjunta das duas subunidades do HIF-1 humano (HIF-1 α e ARNT) nessas células e avaliar sua atividade ligante ao DNA através de ensaios de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA). Também procurar motivos HRE na região promotora de todos os genes de *S. cerevisiae*.

III. Objetivos Específicos

1. Amplificar e clonar os genes HIF-1 α e HIF-1 β (ARNT) humanos em vetores para expressão em *S. cerevisiae*.
 2. Detectar a expressão das proteínas HIF-1 α e ARNT através de Western Blot.
 3. Verificar, através de ensaios de EMSA, a interação das subunidades do HIF-1 humano expressas em leveduras com uma seqüência humana contendo o motivo HRE.
 4. Comparar o crescimento em meio líquido de leveduras que expressam o HIF-1 humano e leveduras tipo selvagem (não transformadas), transformadas com o vetor vazio e transformadas com a versão truncada do ARNT.
 5. Procurar por elementos responsivos à hipóxia (HRE) no genoma da levedura *S. cerevisiae* usando ferramentas de bioinformática.
 6. Verificar, através de ensaios de EMSA, a ligação de proteínas endógenas de leveduras ao motivo HRE derivado do *enhancer* do gene da eritropoietina humana.
-

IV. Material

1. Linhagens de leveduras

Obtivemos da Dr. Edith Gralla (UCLA, EUA) leveduras mutantes de *S. cerevisiae* que não codificam a enzima CuZnSOD ou a enzima MnSOD ou ambas. Essas linhagens mutantes foram chamadas de EG118, EG110 e EG133, respectivamente. Foram derivadas da linhagem de leveduras tipo selvagem EG103. Essas células mutantes são um modelo simples para se estudar o papel do estresse oxidativo, e quando submetidas a condições de alta aeração sofrem uma drástica perda da viabilidade nas primeiras semanas de crescimento (Longo *et al.*, 1996). Foram usadas neste trabalho as seguintes linhagens da levedura *S. cerevisiae*:

- EG103 (*MAT* α , *leu2-3,11 his3 Δ 1 trp-289a, ura3-52*)
- EG110 (como EG103 exceto ***sod2 Δ ::TRP1***)
- EG118 (como EG103 exceto ***sod1 Δ ::URA3***)
- EG133 (como EG103 exceto ***sod1 Δ ::URA3*** e ***sod2 Δ ::TRP1***)

Essas linhagens foram obtidas com a Dra. Edith Gralla da Universidade da Califórnia em Los Angeles (UCLA).

2. Linhagem bacteriana

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho foram:

- XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, E.U.A.). *supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, relA1, lac⁻, F' [ProAB⁺, lacIq, lacZ Δ M15, Tn10(tet^r)]*. Linhagem para a produção de plasmídeos recombinantes.
-

3. Meios de cultura

LB (Luria-Broth)

Peptona de caseína	1,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	1,0 % (p/v)
pH 7,2	

LB-ágar

Adicionar ágar bacteriológico a uma concentração final de 1,4% (p/v)

SOB

Peptona de caseína	2,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	0,05 % (p/v)
KCl	0,00186 % (p/v)
pH 7,2	

SOC

Meio SOB	97 mL
Glicose 2M (filtrada)	1 mL
MgCl ₂ 1M (autoclavado)	1 mL
MgSO ₄ 1M (autoclavado)	1 mL
pH 7,2	

SC

YNB	0,67 % (p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)

Adicionar os suplementos e aminoácidos quando necessário de acordo com Kaiser *et al.*, 1994, como também um excesso de 4X de triptofano, uracil, adenina, metionina e histidina (Gralla e Valentine, 1991). Para selecionar plasmídeos

contendo as marcas de seleções LEU2, URA3 ou TRP1, omitir leucina, uracil ou triptofano do meio.

YPD

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona	2 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)

4. Tampões de reação

Tampão da Taq Polimerase (Cenbiot[®]; Pelotas, Brasil) concentrada 10X

Tris-HCl (pH 8.5)	100 mM
KCl	500 mM

Tampão único para a enzima de restrição *BamH* I 1X (New England Biolabs; Ipswich, E.U.A)

NaCl	150 mM
Tris-HCl (pH 7,9)	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM

NEB 2 (Tampão 2 da New England Biolabs) 1X

NaCl	50 mM
Tris-HCl (pH 7,9)	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM

Tampão H da Promega (Madson, E.U.A) concentrado 10X

Tris-HCl, pH 7,5	900 mM
MgCl ₂	100 mM
NaCl	500 mM

Tampão para a enzima polinucleotídeo quinase da Promega concentrado**10X**

Tris-HCl, pH 7,6	700 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	50 mM

Tampão da enzima T4 DNA ligase da New England Biolabs concentrado**10X**

Tris-HCl (pH 7,5)	500 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP	10 mM
BSA	250 µg/mL

Tampão de restrição O⁺ da Fermentas (Ontário, Canada) concentrado**10X**

Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	100 mM
BSA	0,1 mg/mL

5. Antibióticos**Ampicilina** **100 mg/mL**

Dissolvida em água estéril. Guardar protegido da luz. Estocar a -20°C.

Tetraciclina **50 mg/mL**Dissolvida em água estéril. Guardar protegido da luz. Estocar a -20°C.

6. Aminoácidos e suplementos

Triptofano	1 % (p/v)
Metionina	1 % (p/v)
Leucina	1 % (p/v)
Histidina	1 % (p/v)
Uracil	0,2 % (p/v)
Adenina	0,2 % (p/v)

Dissolver em água e autoclavar. Uracila e adenina devem ser mantidas a temperatura ambiente para evitar precipitação.

7. Soluções

dNTP (desoxiribonucleotídeos trifosfatos; N= A, T, C ou G)

Mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, em uma concentração estoque de 10 mM cada.

Brometo de etídeo 10 mg/mL

Dissolvido em água

Guardar protegido da luz.

X-gal 20 mg/mL

Dissolver o X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidase) em N, N dimetil-formamida.

IPTG 200 mg/mL

Dissolver o IPTG (isopropil-tio- β -D-galactosidase) em água .

Solução II para minipreparação de plasmídeos

NaOH	0,2 M
SDS	1 % (p/v)

Solução III para minipreparação de plasmídeos

Acetato de sódio	3 M
Ácido acético	2 M

**Solução de BSA (albumina de soro bovino) concentrada 10X (1 mg/mL) –
New England Biolabs****Agarose 0,8% (p/v)**

Ferver a agarose tipo II junto com o tampão TEB 1X no microondas. Esperar esfriar e adicionar o brometo de etídeo para uma concentração de 0,5 µg/mL. Verter no suporte de eletroforese.

Tampão TE 1X

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA	1 mM

**Tampão de lavagem (*New Wash*) para eluição de DNA de gel de agarose
1X**

Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
Etanol	50 % (v/v)
Estocar a -20°C	

Sílica

Solução de 50% de sílica (Sigma) em água (v/v)

Mistura PLATE (usada para a transformação de leveduras)

45% (p/v) PEG 4000 estéril	90 mL
LiOAc 1 M	10 mL

Tris-HCl 1 M (pH 7,5)	1 mL
EDTA 0,5 M	0,2 mL

Tampão de amostra concentrado 6X

Azul de brofenol	0,25 % (p/v)
Glicerol	50 % (p/v)
TEB 10X	5 X

Tampão de lise (para lisar células de leveduras)

HEPES, pH 7,5	25 mM
MgCl ₂	5 mM
DTT	0,1 mM
KCl	50 mM
Glicerol	10 % (v/v)

Adicionar inibidores de proteases e o DTT apenas antes do uso (10 µg/mL pepstatina, 10 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL leupeptina e 1 mM PMSF)

Tampão de lise (para lisar células HeLa)

Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	150 mM
NP-40 (v/v)	0,5 % (v/v)

Adicionar inibidores de proteases antes do uso (1 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, 1 µg/mL pepstatina A, 1 mM PMSF e 1 mM vanadato de sódio)

Tampão de extração de núcleos de células HeLa

HEPES, pH 7,9	20 mM
NaCl	0,4 M
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

Tampão de ligação usado no experimento de EMSA

Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
KCl	50 mM
NaCl	50 mM
MgCl ₂	1 mM
EDTA	1 mM
DTT	5 mM
Glicerol	5 % (v/v)

TEB concentrado 10X

Trizma base	0,89 M
Ácido bórico	0,89 M
EDTA (pH 8,2)	0,08 M

TEB diluído 0,5X

Trizma base	44,5 mM
Ácido bórico	44,5 mM
EDTA (pH 8,2)	2,5 mM

Para experimentos de EMSA, resfriar a 4°C antes de usar.

Solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1)

Acrilamida	58 g
Bis-acrilamida	2 g

Dissolver em 200 mL de água milliQ

Gel separador 7,5% - SDS- PAGE

Solução de acrilamida/bisacrilamida 30%	7,5 % (p/v)
Tris-HCl, pH 8,8	375 mM
SDS	0,1 % (p/v)
AMPS 10%	0,5 % (v/v)
TEMED	0,05 % (v/v)

Gel concentrador 5% - SDS- PAGE

Solução de acrilamida/bisacrilamida 30%	5 % (v/v)
Tris-HCl, pH 6,8	100 mM
SDS	0,1 % (p/v)
AMPS 10 %	0,5 % (v/v)
TEMED	0,01 % (v/v)

Tampão de eletroforese SDS-PAGE 1X

Tris-HCl	25 mM
SDS	0,1 % (p/v)
Glicina	196 mM

Tampão de amostra SDS-PAGE 5%

Tris-HCl, pH 6,8	60 mM
SDS	2 % (p/v)
2-β mercaptoetanol	14,4 mM
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)
Glicerol	2 % (v/v)

Solução de transferência SDS-PAGE

Tris-HCl, pH 8,8	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,037 %
Metanol	20 %

PBS 1X

NaCl	136,9 mM
Na ₂ HPO ₄	8,09 mM
NaH ₂ PO ₄	1,76 mM
KCl	2,69 mM

PBS-T diluído 0,5X

Tampão PBS	1 X
Tween 20	0,05 % (v/v)

Solução bloqueadora para Western Blot

Leite em pó desnatado 5% (p/v) em PBS 1X

Solução de detecção por Quimioluminescência

Tris-HCl, pH 8,5	100 mM
H ₂ O ₂	2,65 mM
Luminol	0,45 mM
Ácido cumárico	0,625 mM

Tampão APS (solução para a fosfatase alcalina)

Tris-HCl, pH 9,5	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl ₂	5 mM

Nitro Blue Tetrazolium (NBT) – Invitrogen (Carlsbad, E.U.A.).

50 mg/mL

5-Bromo 4-cloro 3-indolil fostato (BCIP) – Invitrogen

50 mg/mL

Gel nativo 5% - EMSA

Solução de acrilamida/bisacrilamida 30%	5 % (v/v)
TEB 10 X	0,5 % (v/v)
AMPS 10 %	0,24 % (v/v)
TEMED	0,04 % (v/v)

8. Anticorpos***Anticorpos Primários***

IgY anti-HIF-1 α – anticorpo policlonal produzido através da imunização de gema de galinha com a região carboxi terminal da proteína HIF-1 α (região

correspondente aos aminoácidos 530 a 825) fusionada à proteína glutatona S-transferase (Camenish *et al.*, 1999).

Mgc3 anti-HIF-1 α – anticorpo monoclonal IgG1 produzido a partir da imunização de camundongo com a região carboxi terminal da proteína HIF-1 α (região correspondente aos aminoácidos 530 a 825) fusionada à proteína glutatona S-transferase (Camenish *et al.*, 1999).

Anti-ARNT – anticorpo policlonal produzido a partir da imunização de coelho com a região carboxi-terminal do ARNT humano (aminoácidos 499-789) (Salomon-Ngyuyen *et al.*, 2000). Anticorpo doado pela Dr^a. Véronique Della-Valle (CEPH, França).

Anti-ARNT AbCam – anticorpo monoclonal produzido a partir da imunização de camundongo com peptídeo sintético correspondente aos aminoácidos 771-789 do ARNT humano. Produto da empresa AbCam (2B10; Cambridge, Reino Unido).

Anticorpos Secundários

Coelho anti-galinha – anticorpo produzido a partir da imunização de coelho com anticorpo de galinha. Conjugado com peroxidase de rabanete (Promega).

Cabra anti-camundongo – anticorpo produzido a partir da imunização de cabra com anticorpo de camundongo. Conjugado com peroxidase de rabanete (Jackson Immuno Research; West Grove, E.U.A.).

Cabra anti-coelho – anticorpo produzido a partir da imunização de cabra com anticorpo de coelho. Conjugado com fosfatase alcalina.

9. Enzimas de Restrição

New England Biolabs

*Bam*HI (20 U/ μ L)

*Hind*III (20 U/ μ L)

Promega

*Eco*RI (10 U/ μ L)

*Pst*I (10 U/ μ L)

Outras

*Bg*II (10 U/ μ L) – Fermentas

*Kpn*I (6 U/ μ L) – GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido)

10. Outras enzimas

***Taq* Polimerase (2 U/ μ L) - Cenbiot[®]**

***Platinum* Polimerase (5 U/ μ L) - Invitrogen[®]**

T4 DNA ligase (400 U/ μ L) – New England Biolabs

T4 polinucleotídeo quinase (10 U/ μ L) – Promega

RNAse**10 mg/mL**

Dissolver 10 mg de RNAse em 1 mL de Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, NaCl 15 mM. Aquecer a 100°C por 15 min e depois deixar esfriar vagarosamente à temperatura ambiente. Aliquotar e guardar a -20°C.

11. Marcadores de massa molecular***DNA***

1 kb ladder - Gibco BRL (E.U.A.)

1 kb ladder – GE Healthcare

Marcador caseiro – preparado por Túlio César

O modo de preparo deste marcador não será descrito em detalhes, pois pretendemos patentear-lo. Brevemente, purificação de DNA plasmidial em larga escala de várias construções gênicas obtidas durante esse projeto foram preparadas. Cerca de 20 µg de cada uma dessas construções foram digeridas com enzimas de restrição (*Bam*HI ou *Eco*RI ou *Hind*III). Cada sistema de digestão foi incubado durante a noite e em seguida purificados pelo método de precipitação com etanol 100% (2,5 volumes) e acetato de amônio (0,5 volume) como descrito no item 7 da seção de Métodos. Um micrograma de cada sistema de digestão foi reunido em um tubo eppendorf e adicionado de tampão de amostra de DNA para uma concentração final de 1X. A mistura foi analisada em gel de agarose e foi verificado o padrão de migração. Assim, obtivemos o marcador de massa molecular caseiro.

Proteína

Pré-stained BenchMarker – Invitrogen

12. Vetores

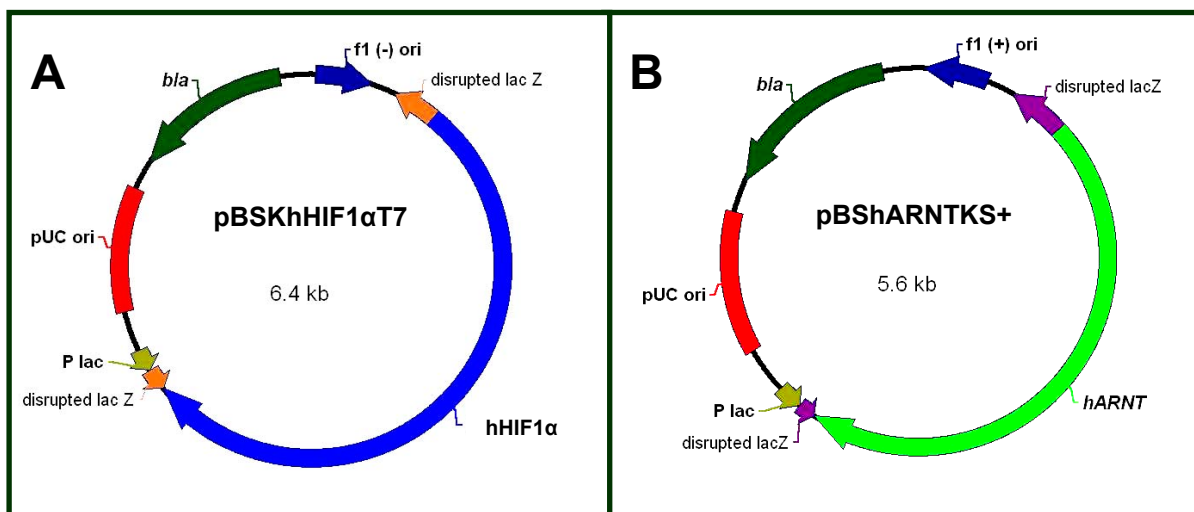


Figura 7. Mapas físicos dos plasmídeos pBSKhHIF1 α T7 e pBSshARNTKS⁺. As subunidades HIF-1 α (painel A) e ARNT (painel B) humanas, estão clonadas nos vetores pBlueScript KS⁻ e pBlueScript KS⁺, respectivamente. Essas construções foram fornecidas pelo Dr. Max Gassmann (Universidade de Zurique). Esses plasmídeos foram usados para clonagem em células bacterianas e foram utilizados como DNA molde em reações de amplificação de DNA.

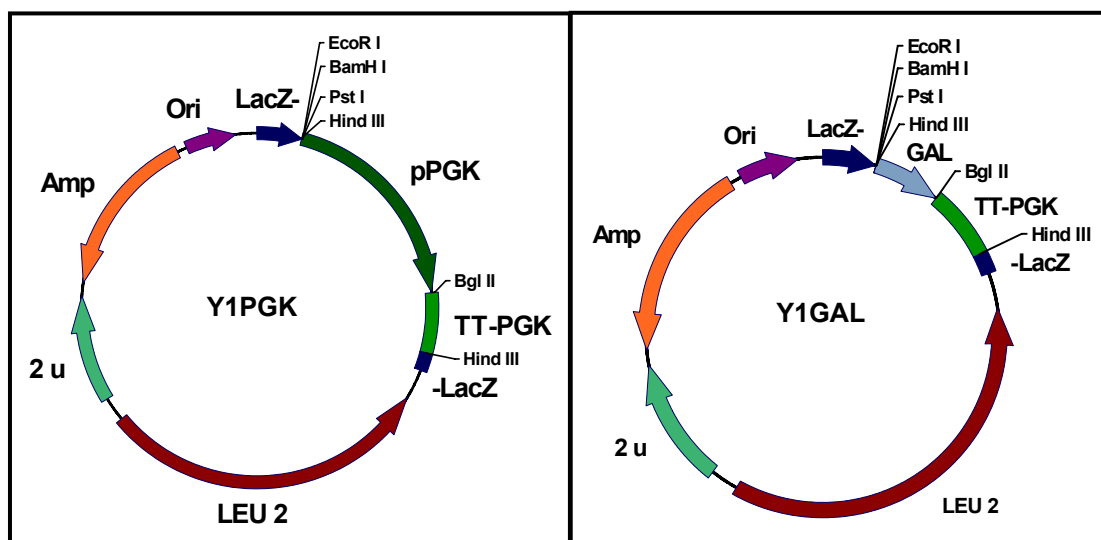


Figura 8. Mapas físicos dos plasmídeos Y1PGK e Y1GAL (contruídos pelo Dr. Mauro Xavier). Estes plasmídeos contêm a região do sítio múltiplo de clonagem derivado do plasmídeo YEp351. Possuem as regiões promotoras das enzimas fosfoglicerato quinase (PGK) e β -galactosidase (GAL) e a região terminadora da transcrição da enzima PGK (TT-PGK). Contêm o gene de levedura *LEU2* como marca de seleção auxotrófica. Entre os promotores (PGK ou GAL) e a TT_PGK encontra-se um

único sítio de clonagem que corresponde ao sítio de *Bgl*II, onde foram inseridos os genes correspondentes as subunidades do HIF-1 α ou HIF-1 β .

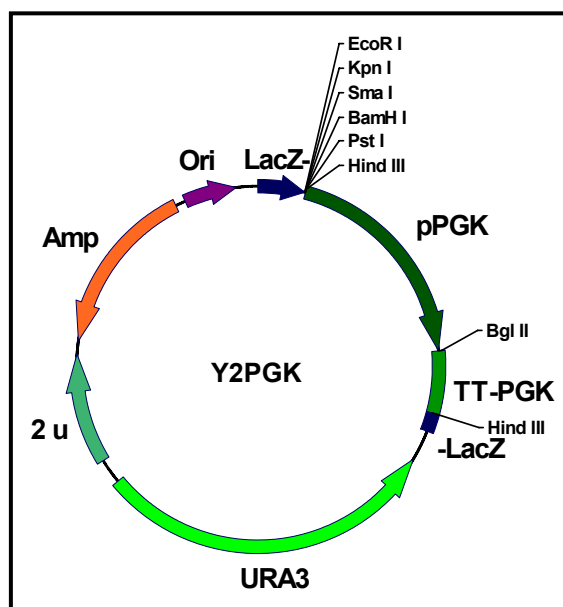


Figura 9. Mapa físico do plasmídeo Y2PGK (construído pelo Dr. Mauro Xavier). Este plasmídeo contém a região do sítio múltiplo de clonagem derivado do plasmídeo YEp352. Possui a região promotora da enzima fosfoglicerato quinase (PGK) e a região terminadora da transcrição da enzima PGK (TT-PGK). Contêm o gene de levedura *URA3* como marca de seleção auxotrófica. Entre os promotores PGK e a TT-PGK encontra-se um único sítio de clonagem que corresponde ao sítio de *Bgl*II, onde foi inserido o gene correspondente a subunidade β do HIF-1 (ARNT).

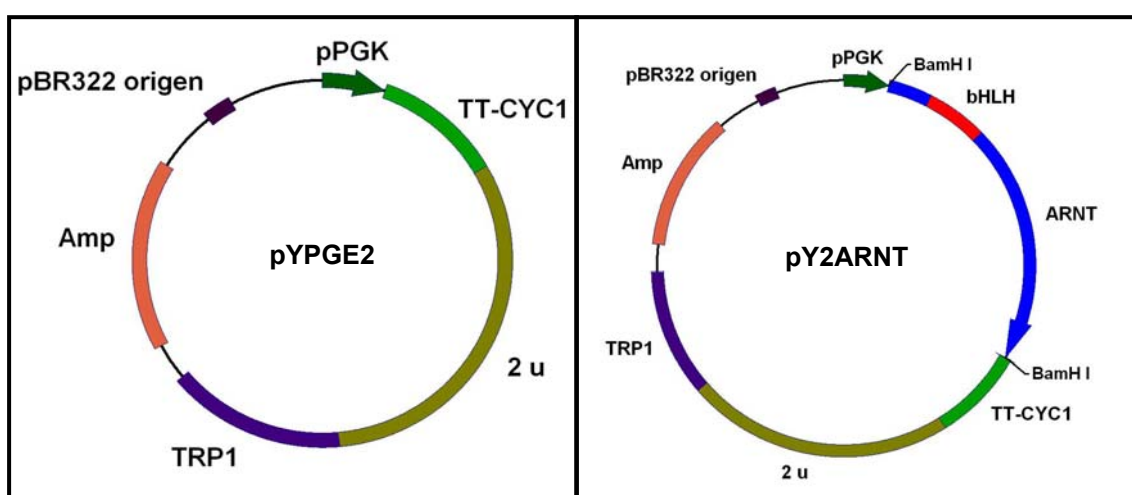


Figura 10. Mapas físicos dos plasmídeos pYPGE2 e pY2ARNT. Esses vetores possuem a região promotora da enzima fosfoglicerato quinase (PGK) e a região terminadora da transcrição da enzima

PGK (TT-PGK). Contêm o gene de levedura *TRP1* como marca de seleção auxotrófica. Os vetores pY2ARNT e pYPGE2 foram doados pelo Dr. Christopher Bradfield (USA).

13. Oligonucleotídeos

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados no estudo. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação (1, 3, 5 e 7) e sequenciamento (2, 4, 6 e 8) automático das subunidades do HIF-1 (HIF-1 α e ARNT). A região sublinhada indica o sítio para a enzima de restrição *Bam*HI. Os códons de iniciação e de terminação estão em negrito.

Subunidade	Oligonucleotídeo	Seqüência
α	1) HIFF-1	5' - <u>CGGATCC</u> AT GGAGGGCGCCGCC - 3'
	2) HIFF-2	5' - TGATACCAACAGTAACCAAC - 3'
	3) HIFR-1	5' - <u>CGGATCC</u> T CAGTTAACTTGATCCAAAGC - 3'
	4) HIFR-2	5' - TTTTAAATTCATCAGTGGTGG - 3'
β	5) ARNTF-1	5' - <u>CGGATCC</u> AT GGCGGCGACTACTGC - 3'
	6) ARNTF-2	5' - CAGCACACTCTATGATCA - 3'
	7) ARNTR-1	5' - <u>CGGATCC</u> CT ATTCTGAAAAGGGGGAAAC - 3'
	8) ARNTR-2	5' - TTGCCCTGGGAGGAGAATAGC - 3'
	9) tARNT-F*	5' - <u>GGATCC</u> AT GAAGTCCTTGCGGGGAAGTGGC - 3'

Os oligonucleotídeos foram sintetizados por diferentes empresas (Gibco BRL, Integrated DNA Technologies, Inc; Coralville, E.U.A.). * indica o oligonucleotídeo utilizado para amplificar o gene *arnt* para obter sua versão truncada.

Oligonucleotídeos utilizados para o EMSA (Ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética).

Oligonucleotídeo W18, derivado da *enhancer* 3' do gene humano da eritropoietina (fita senso, 5'-GCCCTACGTGCTGTCTCA-3'). Seqüência sublinhada indica região central do HRE.

V. Métodos

Clonagem das subunidades do HIF-1

1. Obtenção dos genes completos das subunidades do HIF-1 por reação em cadeia da polimerase (PCR)

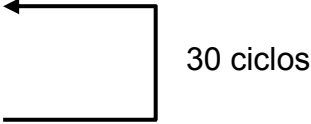
Para obtenção dos genes das subunidades do HIF-1 (α e β) foram montadas reações de PCR utilizando como DNA molde os vetores pBSKhHIF1 α T7 e pBSHARNTKS⁺ construídos pelo Prof. Gregg Semenza (USA) e obtidos com o Dr. Max Gassmann (Universidade de Zurique, Suíça). Os sistemas de reações continham, tampão de reação da polimerase *Platinum* 1X, 0,2 mM de solução de dNTPs, 2 mM de MgSO₄, 0,5 μ M de cada um dos oligonucleotídeos (Tabela 4, oligos 1 e 3 para amplificar HIF-1 α e oligos 5 e 7 para amplificar o ARNT), 1 ng de DNA molde e 1 unidade de Taq *Platinum*. As etapas de amplificação estão descritas abaixo.

Desnaturação inicial:	94°C, 1min	
Desnaturação:	94°C, 30 s	← 35 ciclos
Anelamento:	55°C, 30 s	
Extensão:	68°C, 2,5 min	
Extensão final:	68°C, 5 min	
Final do ciclo:	4°C	

2. Obtenção da versão truncada do ARNT por PCR.

Para obtenção da versão truncada do ARNT foram montadas reações de PCR utilizando como DNA molde o vetor pBSHARNTKS⁺ e os oligonucleotídeos que amplificam o ARNT a partir do nucleotídeo 418, excluindo assim a região que codifica para o domínio bHLH da proteína. Os sistemas de reações continham,

tampão de reação 1X da *Taq* Polimerase, 0,2 mM de solução de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 μM de cada um dos oligonucleotídeos (Tabela 4; 7 e 9), 1 ng de DNA molde e 2 unidades de *Taq* Polimerase (Cenbiot[®]). As etapas de amplificação estão descritas a baixo.

Desnaturação:	94°C, 1 min	
Anelamento:	58°C, 1 min	
Extensão:	72°C, 1 min	
Extensão final:	72°C, 5 min	
Final do ciclo:	4°C	

Os produtos das amplificações obtidos nos itens 1 e 2 foram purificados utilizando colunas de purificação de produtos de PCR de um kit da Qiagen[®]. A purificação foi feita de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram usados numa reação de ligação de clonagem pGEM[®]-T Easy (Promega).

3. Sistema de ligação

Os produtos de PCR obtidos foram clonados no plasmídeo pGEM[®]-T Easy em reações de 15 μL , que continham 100 ng do produto de PCR, 25 ng do vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy, 400 unidades da enzima T4 DNA ligase e tampão da T4 DNA ligase 1X. Os sistemas de ligações foram incubados a temperatura ambiente por uma hora.

4. Preparação de células eletrocompetentes

Uma colônia da linhagem bacteriana XL-1 Blue foi inoculada em 10 mL de meio SB contendo 30 $\mu g/mL$ de tetraciclina e incubou-se esse pré-inóculo durante a noite a 37°C sob agitação a 250 rpm. No dia seguinte, foram inoculados 7,5 mL do pré-inóculo em um frasco contendo 250 mL de meio SB onde foram adicionados

5 mL glicose 20% (p/v) e 5 mL 1 M $MgCl_2$ em um Erlenmeyer de 1 litro. O frasco foi incubado a 37°C a 250 rpm até a cultura atingir uma densidade ótica (OD) a 600 nm igual a 0,8. Após a cultura ter atingido a OD ideal, o frasco foi resfriado no gelo, assim como todos os materiais utilizados nas etapas subseqüentes. A cultura então, foi centrifugada a 3.000 *xg* por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspendido em 25 mL de 10% glicerol (v/v) gelado usando-se pipetas de vidro estéreis pré-resfriadas e posteriormente completado com mais 150 mL de 10% (v/v) glicerol gelado. A cultura foi centrifugada a 3.000 *xg* por 20 min a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em 25 mL de 10% (v/v) glicerol gelado. As suspensões de células foram transferidas para um tubo falcon de 50 mL previamente resfriado e centrifugado nas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e assim as células foram ressuspendidas no volume residual de glicerol (normalmente de 1 a 2 mL). Alíquotas de 100 μ L foram distribuídas em tubos de 1,5 mL novos e estéreis e em seguida congeladas em banho de gelo-seco/álcool. As alíquotas foram estocadas a -80°C.

5. Preparação de células termocompetentes

Uma colônia da linhagem bacteriana XL-1 Blue foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo 30 μ g/mL tetraciclina e incubou-se esse pré-inóculo durante a noite a 37°C sob agitação a 250 rpm. No dia seguinte, a cultura foi transferida para um frasco de Erlenmeyer de 1 L contendo 100 mL de meio LB novo. A cultura foi incubada nas mesmas condições anteriores até atingir uma densidade ótica (OD) a 600 nm de 0,35 a 0,45. A seguir a cultura foi resfriada no gelo por 15 min e em seguida centrifugada a 2.500 *xg* por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado uma vez com 50 mL de $CaCl_2$ 0,1 M gelado e mantido no gelo por 20 min. A cultura foi novamente centrifugada a 2.500 *xg* por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 2 mL de $CaCl_2$ 0,1 M gelado contendo 25% (v/v) de glicerol. Alíquotas de 100 μ L foram preparadas e congeladas em banho de gelo-seco/álcool. As alíquotas foram estocadas a -80°C.

6. Transformação por eletroporação

A transformação foi feita pelo método de eletroporação, onde foi usada a linhagem bacteriana de *E. coli*, XL1-blue. Os sistemas de transformação foram feitos misturando-se 50 μL de células competentes e 5 μL do sistema de ligação em um tubo eppendorf novo. A mistura foi colocada dentro de uma cubeta de eletroporação previamente resfriada no gelo. O choque elétrico foi dado usando os seguintes parâmetros: 2,5 V, 25 μF e 200 Ω . Após o choque elétrico as células foram recuperadas lavando o interior da cubeta com 1 mL de meio SOC. A lavagem com meio SOC foi repetida três vezes. As células em suspensão foram colocadas dentro de um tubo Falcon de 50 mL e então incubadas por uma hora sob agitação a 230 rpm a 37°C.

As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 xg por 5 min e o sobrenadante foi descartado deixando 200 μL de meio remanescente. As células foram ressuspensas no meio remanescente e semeadas em placas de meio LB-ágar contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, 30 μL de X-Gal (20 mg/mL) e 4 μL de IPTG (200 mg/mL). As placas foram incubadas na estufa a 37°C durante a noite. Antes de serem usadas para crescer as células, as placas contendo meio LB-ágar foram incubadas por pelo menos 1 hora a 37°C para permitir que o N, N dimetil-formamida (substância solvente do X-Gal) evaporasse, pois é uma substância tóxica para as células.

7. Extração de DNA plasmidial em pequena escala (mini-prep)

As colônias que potencialmente foram transformadas com os plasmídeos recombinantes (selecionadas por apresentarem uma coloração branca) foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e incubadas durante 20 horas sob agitação a 230 rpm a 37°C. As células foram coletadas pela centrifugação a 3000 xg durante 2 min e ressuspensas em 200 μL de tampão TE. Foram adicionados 360 μL de solução II nas amostras, as quais foram misturadas gentilmente várias vezes e então incubadas à temperatura ambiente por 5 min. A seguir foram adicionados 300 μL de solução III e as amostras foram gentilmente

misturadas e incubadas no gelo por 5 min. Todas as etapas subsequentes foram feitas a 4°C. As amostras foram centrifugadas à 10.000 *xg* por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos e adicionados de 750 µL de isopropanol. As amostras foram misturadas gentilmente e centrifugadas a 10.000 *xg* por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em 200 µL de tampão TE e adicionados de 200 µg/mL de solução de RNase A. As amostras foram incubadas a 37°C por 20 min. Em seguida foram adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M às amostras, as quais foram misturadas vigorosamente no *vortex*. As amostras foram centrifugadas a 10.000 *xg* por 10 min e o sobrenadante foi transferido para tubos novos.

Foram adicionados aos tubos 750 µL de etanol 100% gelado e então eles foram incubados durante a noite a -20°C ou durante 40 min a -80°C. As amostras foram centrifugadas a 10.000 *xg* por 10 min e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados foram lavados com 500 µL de etanol 70% (v/v), centrifugados a 10.000 *xg* por 2 min e secados à temperatura ambiente por 10 min. Os precipitados foram finalmente ressuspensos em 50 µL de água milliQ. Posteriormente, uma alíquota do DNA purificado de cada clone foi digerida com *Bam*HI para que fosse possível confirmar a presença da quimera (vetor pGEM[®]-T Easy ligado aos genes HIF-1α ou HIF-1β).

8. Sequenciamento

As amostras de DNA onde foram confirmadas a presença dos genes *hif-1α* ou *arnt* ou *arnt* truncado foram submetidas ao seqüenciamento automático de DNA no aparelho MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) utilizando-se o kit MegaBACE Dye Terminator e os oligonucleotídeos descritos na Tabela 4 (oligonucleotídeos 1 a 4 para o HIF-1α; oligonucleotídeos 5 a 8 para o ARNT e oligonucleotídeos 7 a 9 para o gene da versão truncada do ARNT).

9. Digestão de DNA com a enzima de restrição *Bam*HI para liberação dos genes das subunidades do HIF-1

Após a confirmação das seqüências de nucleotídeos das subunidades do HIF-1, foram montados sistemas de digestão com a enzima *Bam*HI para liberar os fragmentos desejados, que foram usados na sub-clonagem. Foram montados sistemas de digestão contendo aproximadamente 10 µg de DNA (pGEM[®]-T Easy contendo as subunidades do HIF-1; α ou β), 0,1 mg/mL BSA, 10 unidades da enzima de restrição *Bam*HI e tampão de reação da enzima 1X. As amostras foram incubadas durante a noite a 37°C e então todo volume de cada sistema de digestão foi aplicado em gel de agarose 0,8% (p/v) e submetido à eletroforese.

10. Eluição de DNA de gel de agarose

Após os fragmentos (vetor e inserto) terem se separado adequadamente no gel de agarose, os fragmentos correspondentes aos insertos foram cortados do gel com um bisturi e colocados em tubos eppendorfs novos de 1,5 mL. Os pedaços de géis contendo os fragmentos de DNA foram pesados e então adicionados de três volumes de NaI 6M. As amostras foram incubadas a 55°C com agitações periódicas no *vórtex*. Após todo o gel de agarose ter se dissolvido completamente foram 5 µL de suspensão de sílica [Sigma, S5631, ressuspendida em água a 50% (v/v)]. As amostras foram misturadas no *vórtex* e então incubadas no gelo por 5 min. A seguir foram centrifugadas por 10 seg a 10.000 *xg*. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspendidos em 0,5 mL de NaI 6 M e novamente centrifugados. Os precipitados foram lavados uma segunda vez com 0,25 mL de NaI 6 M e depois com o tampão de lavagem *New Wash* (previamente estocado a -20°C) como descrito abaixo:

- Adição de 50 µL de *New Wash* e ressusensão no *vortex*
- Adição de 250 µL de *New Wash* e agitação no *vortex*
- Centrifugação a 10.000 *xg* por 10 seg à temperatura ambiente
- Descarte dos sobrenadantes

Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. Após a última lavagem todo o restante de tampão de lavagem foi cuidadosamente retirado e os precipitados

foram ressuspendidos em 10 μ L de tampão TE e incubados a 55°C por 5 min. As amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes e os sobrenadantes foram reunidos, resultando em 30 μ L de material eluído correspondente a cada DNA (HIF- α e ARNT).

Obtenção dos plasmídeos de leveduras para subclonagem.

11. Transformação por choque térmico.

Foram usados os vetores de expressão em leveduras, YEp351:PGK, YEp352:PGK, YEp351:GAL e o pYPGE2, os três primeiros aqui chamados de Y1PGK, Y2PGK, Y1GAL, respectivamente. As características desses vetores estão ilustradas nas Figuras 8 a 10. Em cada tubo contendo 50 μ L de células de *E. coli* competentes da linhagem XL-1 Blue, previamente descongeladas no gelo, foram adicionados 30 ng dos plasmídeos, 22,5 μ L de tampão Tris-HCl 5 mM / MgCl₂ 5 mM, pH 7.4. Os componentes foram misturados gentilmente e mantidos no gelo por 30 min. O choque térmico foi dado incubando os tubos a 37°C durante 5 min. Posteriormente os tubos foram mantidos no banho água-gelo não mais que 5 min. Após esta etapa, foram adicionados 200 μ L de meio LB em cada um dos tubos os quais foram então incubados por mais 1 hora a 37°C. Finalmente, aproximadamente de 100 a 150 μ L de células foram plaqueadas em meio LB-ágar, contendo 100 μ g/mL de ampicilina. As placas foram então incubadas durante a noite a 37°C. No dia seguinte algumas colônias de cada sistema de transformação foram selecionadas para proceder com a extração plasmidial em pequena escala, como descrito no item 7.

12. Digestão dos vetores Y1PGK, Y1GAL, Y2PGK e pYPGE2 com enzimas de restrição

12.1. Vetores Y1PGK e Y1GAL

Os plasmídeos Y1PGK e Y1GAL purificados foram linearizados com a enzima *Bgl*III (sítio de clonagem). As condições na reação de digestão estão mostradas abaixo.

Plasmídeo	10 μ L (aproximadamente 20 μ g)
<i>Bgl</i> III (10 U/ μ L)	3 μ L
Tampão O ⁺ 10X	2 μ L
Água milliQ	4 μ L

As reações foram incubadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte, todo o sistema de digestão foi precipitado adicionando-se a cada sistema 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M; 1 μ L de glicogênio 5 mg/mL e 2,5 volumes de etanol 100%. As amostras foram misturadas e incubadas a -80°C durante 40 min. Foram então centrifugadas a 10.000 xg por 10 min a 4°C. Os precipitados foram ressuspensos em 40 μ L de tampão TE. Após a precipitação 1 μ L de cada amostra foi aplicado em gel de agarose 0,8% (p/v) para a quantificação do DNA. Em seguida os vetores digeridos foram reunidos com os genes HIF-1 α ou ARNT, obtidos através de PCR, na presença da enzima DNA ligase para obtenção das construções Y1PGK α , Y1PGK β , Y1GAL α e Y1GAL β .

12.2. Vetor Y2PGK

O plasmídeo Y2PGK foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III para obtenção do fragmento contendo a marca de seleção URA3 (vetor YEp352), como mostra na figura 20. O vetor YEp352 linearizado foi utilizado para ser ligado ao cassete de expressão contendo o gene *arnt* (pPGK-ARNT-TT-PGK) proveniente da digestão da construção Y1PGK β com a enzima *Hind* III. As condições na reação de digestão estão mostradas abaixo.

Plasmídeo (Y2PGK e Y1PGK β)	10 μ L (aproximadamente 20 μ g)
<i>Hind</i> III (10 U/ μ L)	3 μ L
Tampão H 10X	2 μ L
Água milliQ	4 μ L

Os sistemas de digestão foram incubados durante a noite a 37°C. Em seguida todo o material foi aplicado em gel de agarose e submetido à eletroforese. Após a separação dos fragmentos obtidos pelas digestões foi feita a eluição do DNA como descrito anteriormente dos seguintes fragmentos: YEp352 e pPGK-ARNT-TT-PGK. Assim esses fragmentos foram ligados.

12.3. Vetor pYPGE2

O plasmídeo pYPGE2 foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI para linearizar o vetor onde foi inserido o fragmento correspondente à versão truncada do ARNT. A reação de digestão foi feita como descrito abaixo.

Plasmídeo (pYPGE2)	10 μ L (aproximadamente 10 μ g)
<i>Bam</i> HI (10 U/ μ L)	3 μ L
BSA (1mg/mL)	3 μ L
Tampão para <i>Bam</i> HI 10X	2 μ L
Água milliQ	4 μ L

A reação foi incubada durante a noite a 37°C e em seguida o material foi precipitado como descrito no item 12.1.

13. Defosforilação dos vetores linearizados

Os vetores que foram linearizados através da digestão com enzimas de restrição foram defosforilados para evitar a ligação entre as duas extremidades produzidas pela digestão. A enzima utilizada foi a fosfatase alcalina de intestino de camarão (CIAP, GibcoBRL). O sistema de defosforilação consistiu de 3 μ g de vetor,

0,5 U de CIAP e tampão de defosforilação 1X. O sistema foi incubado a 37°C por 30 min e posteriormente a enzima foi inativada por aquecimento a 74°C durante 10 min. Os vetores foram então utilizados para preparar os sistemas de ligação.

14. Sistemas de ligação

Os sistemas de ligação foram montados de acordo com o esquema abaixo:

Tampão de T4 DNA ligase 10X	2 µL
Vetor (Y1PGK ou YEp352 ou Y1GAL)	50 ng
Inserto (HIF-1 α ou ARNT ou tARNT ou pPGK-ARNT-TT-PGK)	40 ng
T4 DNA ligase	400 U
Água milliQ q.s.p	20 µL

Os sistemas de ligação foram incubados a 16°C durante a noite e em seguida usados para transformar bactérias XL-1 Blue por choque térmico como descrito anteriormente.

15. Transformação de células de leveduras

Células de leveduras foram transformadas com os plasmídeos recombinantes pelo método de acetato de lítio como descrito por Kaiser *et al.* (1994). Uma colônia de cada linhagem de levedura (E103, EG110 e EG118) foi inoculada em 3 mL de meio YPD e as culturas foram incubadas durante a noite a 30°C sob agitação a 200 rpm (até atingir a fase de saturação). Um mililitro de cada cultura foi centrifugado a 10.000 $\times g$ por 1 min à temperatura ambiente. O meio de cultura foi retirado deixando aproximadamente 100 µL de meio remanescente para ressuspender as células sedimentadas. Foram adicionados 3 µL de DNA plasmidial (aproximadamente 1 µg de DNA). Não foi necessário adicionar DNA carreador, pois as amostras preparadas contêm RNA contaminante que funciona como carreador. As amostras foram misturadas vigorosamente no *vortex* e adicionadas de 0,5 mL de mistura PLATE. Após serem misturadas no *vortex* 20 µL de DTT 1 M foram adicionados a cada

sistema de transformação e novamente misturados no *vortex*. As amostras foram então deixadas na bancada durante 24 h e em seguida submetidas ao choque térmico (42°C, 10 min). Foram então centrifugadas a 10.000 *xg* por 30 s à temperatura ambiente. Aproximadamente 100 μ L de cada amostra foram plaqueados em meio mínimo Sc seletivo. As placas com os sistemas de transformação foram incubadas a 30°C por cerca de 3 dias. A constituição dos sistemas usados na transformação de ligação está sumarizada na Tabela 5.

Tabela 5. Vetores obtidos após subclonagem das subunidades do HIF-1 nos vetores de expressão de *S. cerevisiae*. Estão relacionados vetores e os meios seletivos utilizados para obter as células de leveduras recombinantes.

Vetores	Sistema	Marca auxotrófica	Meio seletivo
Y1PGK α	Y1PGK + HIF-1 α	<i>LEU2</i> (Leucina)	SC leu ⁻
Y1PGK β	Y1PGK + ARNT	<i>LEU2</i> (Leucina)	SC leu ⁻
Y2PGK β	Y2PGK + ARNT	<i>URA3</i> (Uracil)	SC ura ⁻
Y1GAL α	Y1GAL + HIF-1 α	<i>LEU2</i> (Leucina)	SC leu ⁻
Y1GAL β	Y1GAL + ARNT	<i>LEU2</i> (Leucina)	SC leu ⁻
pYtARNT	pYPGE2 + tARNT	<i>TRP1</i> (Triptofano)	SC trp ⁻

Para o crescimento de células de leveduras transformadas, suplementos e aminoácidos específicos foram adicionados quando necessário de acordo com Kaiser *et al.* (1994). Além disso, os seguintes componentes do meio de crescimento foram utilizados numa concentração 4 vezes maior do que aquela proposta por esses autores: Triptofano (80 mg/mL), uracila (80 mg/mL), adenina (20 mg/mL), metionina (80 mg/mL), leucina (400 mg/mL) e histidina (80 mg/mL) (Gralla e Valentine, 1991). Para selecionar as linhagens transformadas contendo as marcas de seleção *LEU2*, *URA3* ou *TRP1*, os aminoácidos leucina, uracila ou triptofano foram omitidos do meio de cultura, respectivamente. As linhagens duplo-transformadas que expressam as subunidades do HIF-1 (Y1PGK α /pY2ARNT ou Y1PGK α /pYtARNT) ou a linhagem transformada com os vetores vazios (Y1PGK/pYPGE2, linhagem controle negativo) foram crescidas em meio seletivo sem ambos os aminoácidos leucina e triptofano (Sc leu⁻ trp⁻).

16. Condições de crescimento

Células de leveduras foram usualmente crescidas em meio mínimo Sc. Para o crescimento sob condições de normóxia as células foram crescidas em Erlenmeyers de 125 mL usando uma proporção de 5:1 entre o volume do frasco e o volume do meio. As células foram cultivadas a 30°C a 200 rpm até a OD atingir entre 2 e 3, o que corresponde à fase logarítmica de crescimento. Para o cultivo das células sob baixas condições de oxigênio, essas foram cultivadas em meio líquido em frascos de 50 mL usando uma proporção de 10:9 entre o volume do frasco e o volume do meio. Os frascos de Erlenmeyers foram vedados com uma tampa de borracha e uma alta pressão interna foi evitada através da inserção de uma agulha de seringa conectando o meio interno e o meio externo. As culturas foram incubadas sem agitação a 30°C. A pressão parcial de oxigênio (expressa em mmHg) dentro dos frascos das culturas durante o crescimento celular foi medida usando um OxyLite[®] 2000 (Oxford Optronix). Alternativamente, culturas de células mantidas numa proporção de 5:1 entre o volume do frasco e o volume do meio foram injetadas constantemente com uma mistura gasosa contendo 1% O₂ e 4,95% CO₂, para mantê-las sob condições baixas de oxigênio. Essas culturas foram incubadas sob leve agitação (50 rpm) a 30°C. As células usadas para preparar extratos protéicos para serem usados nos experimentos de Western Blots e EMSA foram crescidas somente durante a noite em meio YPD.

17. Curva de crescimento

As células de leveduras foram crescidas em meio mínimo Sc seletivo. Células crescidas durante a noite foram diluídas em meio Sc seletivo para se obter uma OD a 600nm de 0,05. Trinta mililitros de cada cultura diluída foram transferidos para frascos de 125 mL. A partir desse momento (tempo de crescimento igual a 0), o crescimento das células foi monitorado medindo-se a absorbância (600 nm) das amostras a cada duas horas nas primeiras 24 horas e depois a cada 24 horas.

18. Cultura de células de mamíferos e condições de crescimento

A linhagem humana de células HeLa (carcinoma epitelioide) foi obtida pela ATCC (American Type Culture Collection; número CCL-2). As células foram cultivadas em placas de 100 mm em meio DMEM (contendo 4,5 g/L de glicose e GlutaMax; Gibco-BRL) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado por calor (FCS, Boehringer-annheim), MEM 1X contendo piruvato de sódio, 100 u.i./mL penicilina, 100 mg/mL estreptomina, e MEM 1X contendo aminoácidos não essenciais (todos da Gibco-BRL). As células foram mantidas em atmosfera umidificada contendo 20% O₂ e 5% CO₂ a 37°C. Assim que as células atingiram uma confluência entre 70% a 80% elas foram cultivadas por 16 h sob hipóxia (1% O₂ v/v, Incubador Hera Cell 240) para induzir a expressão do HIF-1 α .

19. Extração de proteínas nucleares de células HeLa

Os extratos nucleares foram preparados como descrito por Kvietikova *et al.* (1995). Dez placas contendo células HeLa (70% a 80% de confluência) foram lavadas duas vezes com PBS 1X previamente resfriado no gelo e incubadas no gelo em tampão de lise por 5 min. Após a incubação as células aderidas foram coletadas usando um pequeno rodo e transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL resfriados. As amostras foram centrifugadas a 800 *xg* por 5 min a 4°C. Os precipitados contendo os núcleos foram ressuspensos em tampão de extração de núcleo contendo inibidores de proteases e transferidos para um homogeneizador Dounce. Os núcleos foram rompidos com 10 passadas no homogeneizador e as amostras foram transferidas para tubos de 1,5 mL e centrifugadas a 20.000 *xg* por 5 min a 4°C. Os sobrenadantes contendo as proteínas nucleares foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C.

20. Preparação de extratos protéicos de leveduras (Para ensaios de Western Blot e EMSA)

As células de leveduras foram coletadas por centrifugação a 2.500 $\times g$ por 5 min a 4°C. Os precipitados foram lavados três vezes com água destilada e ressuspendidos em quatro volumes (p/v) de tampão de lise gelado contendo inibidores de proteases. Os extratos totais de leveduras foram obtidos por rompimento celular usando esferas de vidro de 0,5 mm (lavadas previamente com HCl 0,5 M). As suspensões de células dentro de tubos de 1,5 mL foram vigorosamente agitadas no *vortex* 30 vezes por 30 s com intervalos de 30 s no gelo na presença das esferas. As amostras sem as esferas de vidro foram transferidas para tubos de centrifuga novos de 1,5 mL. As esferas de vidro que ficaram no tubo onde foi feito a lise das células foram lavadas com o tampão de lise e a solução de lavagem foi reunida com o material lisado. As amostras foram centrifugadas a 13.000 $\times g$ por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados, divididos em alíquotas de 20 a 30 μ L e estocados a -80°C. Os extratos totais foram usados nos experimentos de Western Blot e EMSA.

21. Determinação da concentração de proteína

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad) usando albumina de soro bovino como padrão (Bradford, 1976).

22. Teste de mudança da mobilidade eletroforética (EMSA)

Para os experimentos de EMSA o oligonucleotídeo de dupla-fita W18 (fita senso 5'-gccctacgtgctgtctca-3'), o qual contém o HRE (sublinhado) derivado do *enhancer* do gene da eritropoietina humana, foi usado como sonda (Semenza e Wang, 1992). Vinte nanogramas da sonda W18 dupla-fita foram usados para marcar sua extremidade 5' com γ -³²PATP (GE Healthcare) usando 10 unidades da enzima T4 polinucleotídeo quinase (Promega). Reações de ligação entre a sonda W18 e proteínas totais de leveduras continham 50 μ g de extrato protéico de levedura, 0,3

μg do oligonucleotídeo poli-(dI-dC) (GE Healthcare), sonda com atividade de 150.000 c.p.m e tampão de ligação num volume total de 25 μL , e foram incubadas por 1,5 h no gelo. Após a incubação as amostras (25 μL) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 5 % nativo e submetidas à eletroforese a 200 V em tampão TEB 0,5X a 4°C por 2,5 h. O gel foi então cuidadosamente retirado da placa com auxílio de uma folha de papel de filtro Watmann 3MM (dimensões um pouco maiores que as do gel). A folha de papel Whatmann com o gel aderido em sua superfície foi coberta com o plástico *Magicpack* e seca a 80°C por 1 h. A folha de papel já seca gel seco foi exposto a uma tela sensibilizada *Storage Phosphor Screen* por 48 horas e escaneada no Typhoon[®] 9210 (GE Health Science) para aquisição de imagem.

23. Western Blot

Cento e cinquenta microgramas de extratos protéicos de leveduras foram aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida (7,5%) e submetidas à eletroforese. Após a separação adequada das proteínas, na presença de um marcador de massa molecular de proteína, elas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose usando os procedimentos padrões (sistema de Transferência molhada, BioRad). A transferência foi feita durante 2 h a 10°C. Após a transferência a membrana foi rapidamente enxaguada com PBS 1X e corada com solução de Ponceau S (Sigma) para verificar se a transferência tinha sido efetiva. O corante Ponceau S foi retirado lavando-se a membrana com PBS 1X e em seguida a mesma foi incubada durante a noite a 4°C em solução bloqueadora [5% (p/v) leite desnatado em PBS 1X]. O anticorpo primário que foi usado para detectar a expressão do HIF-1 α foi o IgY anti-HIF-1 α (policlonal) produzido em gema de ovo de galinha (diluído 1:100 em PBS 1X; Camenish *et al.*, 1999) e para detectar o ARNT foi usado o anti-ARNT monoclonal produzido em camundongo (AbCam/2B10).

Os tempos de incubação com os anticorpos foram de 2 h e 4 h à temperatura ambiente para a imunodeteccção HIF-1 α e ARNT, respectivamente. Os respectivos anticorpos secundários conjugados com a peroxidase de rabanete foram: anti-galinha produzida em camundongo (Promega) e anti-camundongo produzido em cabra, ambos os anticorpos foram usados em uma diluição de 1:5000. A detecção dos imunocomplexos foi feita através da incubação da membrana na solução de

detecção por quimioluminescência por 1 min. A solução de detecção foi cuidadosamente removida e a membrana exposta a um filme de raio-X (Fuji, Dielsdorf, Switzerland). Também foi testado o anticorpos mgc3 anti-HIF-1 α (anticorpo monoclonal IgG1 produzido em camundongo, Camenish *et al.*, 1999). Porém os melhores resultados foram obtidos com o anticorpo IgY anti HIF-1 α .

O ARNT também foi detectado usando o anticorpo anti-ARNT produzido em coelho (numa diluição 1:2000 em PBS 1X). Após a incubação com o anticorpo primário (descrito anteriormente), a membrana foi lavada três vezes com PBS-T 0,5X e então incubada com o anticorpo secundário anti-coelho produzido em camundongo conjugado com a enzima fosfatase alcalina em uma diluição de 1:5000. Novamente a membrana foi lavada três vezes com PBS-T 0,5X. Os tempos de lavagens foram de 10 seg. Em seguida, a membrana foi lavada uma vez com APB 1X e embebida em 5 mL de uma solução de APB 1X contendo 33 μ L de NBT e 16,5 μ L de BCIP (ambos na concentração de 50 mg/mL). A reação de detecção foi parada lavando-se a membrana com água destilada.

24. Pesquisa pelo motivo HRE humano no genoma de levedura

A *Ferramenta de Análise de Seqüência Regulatória (Regulatory Sequence Analysis Tool – RSAT)* (Helden *et al.*, 2000) foi usada para procurar seqüências do *elemento responsivo à hipóxia (HRE)* humano e o *elemento responsivo a baixas concentrações de oxigênio (LORE)* no genoma da levedura *S. cerevisiae*. A opção *Genome-scale dna-pattern (strings)* foi usada para essa análise. Foi usada a seqüência consenso de mamífero 5'-BRCGTGVBBB-3' (Wenger e Gassmann, 1997) como padrão de procura para o HRE e 5'-ACTCAACAA-3' para LORE. Na seqüência do motivo HRE, B representa os nucleotídeos C, G ou T, R representa A ou G e V representa A, C ou G. Foram escolhidos os seguintes parâmetros na pesquisa feita no RSAT: exclusão das similaridades que sobrepõem qualquer ORF que esteja na posição a montante do promotor, procura em ambas as fitas de DNA (direta e complementar reversa) das seqüências a montante do sítio de iniciação da transcrição na faixa de 800 pb de extensão. Foram visadas somente as regiões a montante, porque em uma procura preliminar na região 3' flanqueadora encontramos somente dois genes que tinham agrupamentos de HRE. Além disso, a maioria dos

sítios de ligação de fatores de transcrição em leveduras estão localizados na região 5'. Portanto, a seqüência codante e a região 3' flanqueadora foram excluídas das análises.

25. Validação dos dados

Para a validação estatística dos HREs encontrados nas seqüências a montante dos genes selecionados pela análise do RSAT foi usada uma biblioteca de PWM (*position weight matrices*) do TRANSFAC e o algoritmo desenvolvido por Hertzberg *et al.* (2005). Foram selecionadas somente as seqüências contendo *clusters* de HREs (dois ou mais motivos; a densidade mínima dos *clusters* em nosso estudo foi de 1 HRE/400 nucleotídeos) para o cálculo dos valores de p e escore de cada motivo. O escore de um motivo é a taxa entre o log da probabilidade da ocorrência de um motivo dada a *position weight matrices* (PWM), dividida pela probabilidade de ocorrência randômica. Os valores de p calculados levam em consideração a probabilidade de ter um motivo com alto escore. Mais precisamente, o valor de p de cada motivo é a probabilidade de ter um certo escore ou mais alto em uma seqüência randômica de mesmo comprimento. Um valor de p baixo significa que em uma seqüência randômica do mesmo comprimento do motivo (randômica significa que A-C-G-T são uniformemente distribuídos), a probabilidade de ter um escore alto para a PWM é baixa. Isso fortalece o fato que o motivo não está lá ao acaso, mas ele tem uma função biológica. Um alto escore e um baixo valor de p podem indicar uma alta afinidade de ligação do fator de transcrição ao promotor. De acordo com a biblioteca de PWM do TRANSFAC, o valor de p gerado para o HRE foi de 0,45. Considerando que esse valor de p é muito alto, quando selecionamos as seqüências foi necessário empregar um valor de corte mais baixo. Usualmente, $p > 0,05$ é usado como o limite, mas nós arbitrariamente decidimos por $p > 0,1$. É possível que um motivo com um valor de p maior que 0,05 seja funcional, já que não se sabe se o valor convencional de 0,05 é um valor de p mais efetivo para ser usado ao selecionarmos os motivos funcionais. Por isso, a seleção de motivos foi de acordo com o valor de p sendo menos restritiva ($p > 0,1$). Para seqüências contendo o mesmo motivo que se sobrepunham, selecionamos aquelas com os menores valores de p. Para mais detalhe sobre PWM e cálculo do valor de p veja Hertzberg

(2003) e Hertzberg *et al.* (2005). As funções descritas dos genes selecionados foram obtidas no banco de dados da levedura *S. cerevisiae* (SGD). Somente genes validados para dois ou mais HREs foram classificados de acordo com suas funções.

26. Análise dos resultados

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa de computador "Mynova", versão 1.3 (S. Brooks, Copyright 1993). Os dados foram descritos como médias \pm SEM (erro padrão da média). Para comparações entre os dados foi utilizado o Anova (teste de Student Newman-Keuls), sendo considerados os valores de $P < 0,05$ como significativamente diferentes.

VI. Resultados

1. Amplificação dos genes HIF-1 α e ARNT por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os fragmentos de DNA correspondentes aos genes completos das subunidades do HIF-1 humano (HIF-1 α e ARNT) foram obtidos a partir da amplificação dos cDNAs que estavam clonados nos vetores pBlueScript (Figura 7, seqüências do genes Figura 12 e 13). Os oligonucleotídeos usados para amplificar os genes (Tabela 4, oligos 1 e 3 para a subunidade α e oligos 5 e 7 para a subunidade β), se anelam nas extremidades das regiões codantes desses genes. Nas reações de amplificação foi utilizada a enzima *Taq Platinum*. Foram obtidos produtos de tamanhos esperados de aproximadamente 2,5 Kb e 2,4 Kb para os fragmentos correspondentes às subunidades α e β respectivamente (Figura 11).

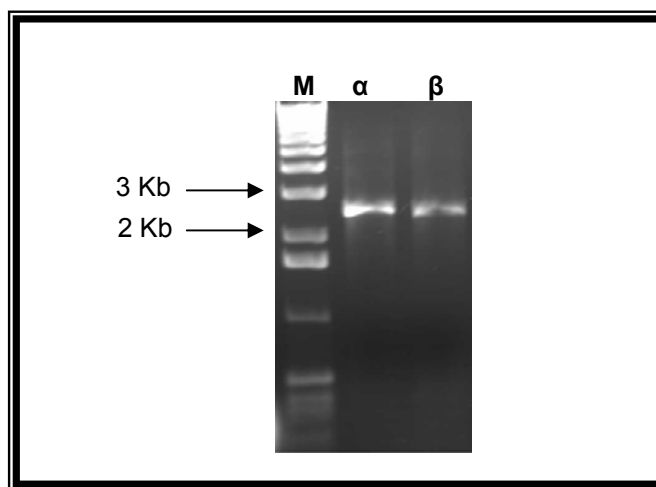


Figura 11. Amplificação dos genes HIF-1 α e HIF-1 β (ARNT) humanos por PCR. Análise dos produtos da PCR em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídeo. Nas reações foi usada a enzima *Taq Platinum*. M: marcador de massa molecular 1 Kb ladder (Gibco®BRL). α : subunidade α , β : subunidade β . Nas reações foram usados 1ng de cada um dos DNA moldes.

atggagggcgccggcgccggaacgacaagaaaaagataagttctgaacgtcgaaaagaa
 1- M E G A G G A N D K K K I S S E R R K E
 aagtctcgagatgcagccagatctcggcgaagtaagaatctgaagtttttatgagcctt
 21- K S R D A A R S R R S K E S E V F Y E L
 gctcatcagttgccacttccacataatgtgagttcgcacatcttgataaggcctctgtgatg
 41- A H Q L P L P H N V S S H L D K A S V M
 aggcttaccatcagctatgtgctgtgaggaaacttctggatgctggatgatttgatatt
 61- R L T I S Y L R V R K L L D A G D L D I
 gaagatgacatgaaagcacagatgaattgcttttatttgaaagccttgatggtttgtt
 81- E D D M K A Q M N C F Y L K A L D G F V
 atggttctcacagatgatggtgacatgattacatttctgataatgtgaacaaatacatg
 101- M V L T D D G D M I Y I S D N V N K Y M
 ggattaactcagtttgaactaactggacacagtggtttgattttactcatccatgtgac
 121- G L T Q F E L T G H S V F D F T H P C D
 catgaggaaatgagagaaatgcttacacacagaaatggccttgtgaaaaagggtaaagaa
 141- H E E M R E M L T H R N G L V K K G K E
 caaacacacagcgaagcttttttctcagaatgaagtgtaccctaactagccgaggaaga
 161- Q N T Q R S F F L R M K C T L T S R G R
 actatgaacataaagtctgcaacatggaaggtattgcaactgcacagccacattcaagta
 181- T M N I K S A T W K V L H C T G H I H V
 tatgataccaacagtaaccaacctcagtggtggtataagaaaccacctatgacctgcttg
 201- Y D T N S N Q P Q C G Y K K P P M T C L
 gtgctgatttgtgaaccatttccatccatcaaatattgaaattccttttagatagcaag
 221- V L I C E P I P H P S N I E I P L D S K
 actttcctcagtcgacacagcctggatgaaatttttatttgatgaaagaattacc
 241- T F L S R H S L D M K F S Y C D E R I T
 gaattgaggggatgagccagaagaacttttagccgctcaatttatgaatattatcat
 261- E L M G Y E P E E L L G R S I Y E Y Y H
 gctttggactctgatcatctgacaaaactcatcatgatatgtttactaaaggacaagtc
 281- A L D S D H L T K T H H D M F T K G Q V
 accacaggacagtagcatgcttgcaaaagaggtggatattgtctgggtgaaactcaa
 301- T T G Q Y R M L A K R G G Y V W V E T Q
 gcaactgtcatatataacaccaagaattctcaaccacagtgattgtatgtgtgaattac
 321- A T V I Y N T K N S Q P Q C I V C V N Y
 gttgtgagtggtattattcagcagcagcttgattttctcccttcaacaaacagaatgtgtc
 341- V V S G I I Q H D L I F S L Q Q T E C V
 cttaaaccgggtgaatcttcagatataaaatgactcagctattcaccaaagttgaatca
 361- L K P V E S S D M K M T Q L F T K V E S
 gaagatacaagtagcctctttgacaaaacttaagaaggaacctgatgctttaactttgctg
 381- E D T S S L F D K L K K E P D A L T L L
 gccccagccgctggagacacaatcatatcttttagattttggcagcaacgcacagaaact
 401- A P A A A G D T I I S L D F G S N D T E T
 gatgacagcaacttgaggaagtaccattatataatgatgtaattgctcccctcaccca
 421- D D Q Q L E E V P L Y N D V M L P S P N
 gaaaaattacagaatataaatttggcaatgtctccattaccaccgctgaaacgccaag
 441- E K L Q N I N L A M S P L P T A E T P K
 ccacttgcagtagtgctgaccctgcactcaatcaagaagttgcattaaaattagaacca
 461- P L R S S A D P A L N Q E V A L K L E P
 aatccagagtcactggaactttcttttaccatgccccagattcaggatcagacacctagt
 481- N P E S L E L S F T M P Q I Q D Q T P S
 ccttccgatggaagcactagacaaagttcacctgagcctaataatgcccagtgaaatattgt
 501- P S D G S T R Q S S P E P N S P S E Y C
 ttttatgtggatagtgatattggtcaatgaattcaagttggaattggttagaaaaactttt
 521- F Y V D S D M V N E F K L E L V E K L E
 gctgaagacacagaagcaagaaccatttttactcaggacacagatttagacttgag
 541- A E D T E A K N P F S T Q D T D L D L E
 atggttagctccctatatcccattggatgatgacttccagttacgttcccttcgatcagttg
 561- M L A P Y I P M D D D F Q L R S F D Q L
 tcaccattagaaagcagttccgcaagcctgaaagcgcaagtcctcaaagcacagttaca
 581- S P L E S S S A S P E S A S P Q S T V T
 gtattccagcagactcaataacaagaacctactgctaatgccaccactaccactgcccacc

```

601-  V F Q Q T Q I Q E P T A N A T T T T A T
    actgatgaattaaacagtgacaaaagaccgatatggaagacattaaatattgattgca
621-  T D E L K T V T K D R M E D I K I L I A
    tctccatctcctacccacatacataaagaaactactagtgccacatcatcaccatataga
641-  S P S P T H I H K E T T S A T S S P Y R
    gataactcaaagtcggacagcctcaccaaacagagcagggaaaaggagtcatagaacagaca
661-  D T Q S R T A S P N R A G K G V I E Q T
    gaaaaatctcatccaagaagccctaacgtggttatctgtcgctttgagtcгаагааactaca
681-  E K S H P R S P N V L S V A L S Q R T T
    gttcctgaggaagaactaaatccaaagatactagctttgcagaatgctcagagaaagcga
701-  V P E E E L N P K I L A L Q N A Q R K R
    aaaatggaacatgatgggttcactttttcaagcagtaggaattggaacattattacagcag
721-  K M E H D G S L F Q A V G I G T L L Q Q
    ccagacgatcatgcagctactacatcacttttctggaaacgtgtaaaaggatgcaaactct
741-  P D D H A A T T S L S W K R V K G C K S
    agtgaacagaatggaatggagcaaaagacaattatttttaataccctctgatttagcatgt
761-  S E Q N G M E Q K T I I L I P S D L A
    agactgctggggcaatcaatggatgaaagtggattaccacagctgaccagttatgattgt
781-  R L L G Q S M D E S G L P Q L T S Y D C
    gaagttaatgctcctatacaaggcagcagaaacctactgcagggggaagaattactcaga
801-  E V N A P I Q G S R N L L Q G E E L L R
    gctttggatcaagttaactga
821-  A L D Q V N -
    ←

```

Figura 12. Seqüências de nucleotídeos (letras minúsculas) e aminoácidos (letras maiúsculas) do gene que codifica a subunidade α do HIF-1 (*hif-1 α*). Oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para a enzima de restrição *Bam*HI (descritos na Tabela 4) foram sintetizados para amplificar a subunidade α do HIF-1 a partir do códon de iniciação da tradução até o códon do final da tradução. Os códons de iniciação (ATG) e terminação (TGA) da tradução estão destacados em negrito. As setas indicam a região de anelamento dos oligonucleotídeos para amplificação do gene *hif-1a*. (■), região de aminoácidos básicos; (■) região *helix-loop-helix*; (■), domínio PAS-A; (■), domínio PAS-B; (■), domínio de transativação C-terminal (TAD-C); (■), domínio de transativação N-terminal (TAD-N); seqüência de aminoácidos em azul se refere à região PAS; região sublinhada se refere ao domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD).

atggcggcgactactgccaaccccgaaatgacatcagatgtaccatcactgggtccagcc
1- M A A T T A N P E M T S D V P S L G P A
attgcctctggaaactctggacctggaattcaaggtggaggagccattgtccagagggct
21- I A S G N S G P G I Q G G G A I V Q R A
attaagcggcgaccagggctggatthttgatgatgatggagaagggaacagtaaatthttg
41- I K R R P G L D F D D D G E G N S K F L
aggtgtgatgatgatcagatgtctaacgataaggagcggthttgccaggtcggatgatgag
61- R C D D D Q M S N D K E R F A R S D D E
cagagctctgctggataaagagagacttgccagggaaaatcacagtgaattgaacggcgg
81- Q S S A D **K E R L A R E N H S E I E R R**
cgacggaacaagatgacagcctacatcacagaactgtcagatattggtaccacctgtagt
101- **R R** N K M T A Y I T E L S D M V P T C S
gccctggctcgaaaaccagacaagctaaccatcttacgcgatggcagthttctcacatgaag
121- **A L A R K P D K L T I L R M A V S H M** K
tccttgccggggaactggcaacaacatccactgatggctcctataagccgtctttcctcact
141- **S L R G T G N** T S T D G S Y K P S F L T
gatcaggaactgaaacatttgatcttgaggcagcagatggctthttctgtttattgtctca
161- D Q E L K H L I L E A A D G **F L F I V S**
tgtgagacaggcaggggtggtgtatggtctgactccgtgactcctgtthttgaaccagcca
181- **C E T G R V V Y V S D S V T P V L N Q P**
cagctctgaatggthttggcagcacactctatgatcaggtgcaccagatgatgtggataaa
201- **Q S E W F G S T L Y D Q V H P D D V D K**
cttctgtgagcagctthttcacttcagaaaatgccctgacagggcgatcctggatctaaag
221- L R E Q L S T S E N A L T G R I L D L K
actggaacagtgaaaaaggaaggtcagcagcttccatgagaatgtgtatgggctcaagg
241- T G T V K K E G Q Q S S M R M C M G S R
agatcgtthttattgcccgaatgaggtgtggcagtagctctgtggaccagthttctgtgaat
261- R S F I C R M R C G S S S V D P V S V N
aggctgagctthttgtgaggaacagatgcaggaatggacttggctctgtaaaggatggggaa
281- R L S F V R N R C R N G L G S V K D G E
cctcacttctgtgggtggctcactgcacaggctacatcaaggcctggccccccagcaggtgtt
301- P H F V V V H C T G Y I K A W P P A G V
tcctcccagatgatgaccagagggctggccaggggaagcaagthttgcctagtggccatt
321- S L P D D D P E A G Q G S K F C L V A I
ggcagattgcaggttaactagthttctccaactgtacagacatgagtaatgthttgtcaacca
341- G R L Q V T S S P N C T D M S N V C Q P
acagagthtcatctcccacacaacattgagggatcttccactthttgtggatcaccgctgt
361- T E **F I S R H N I E G I F T F V D H R C**
gtggctactgttggctaccagccacaggaactcttaggaaagaatattgtagaattctgt
381- **V A T V G Y Q P Q E L L G K N I V E F C**
catcctgaagaccagcagcttctaagagacagcttccaacaggtagtgaattaaaaggc
401- **H P E D Q Q L** L R D S F Q Q V V K L K G
caagtgtctgtctgtcatgthttccggthttccggctagaaccaagaatggctctggatgaga
421- Q V L S V M F R R F R S K N Q E W L W M R
accagctcctthttactthttccagaacccttactcagatgaaattgagtacatcatctgtacc
441- T S S F T F Q N P Y S D E I E Y I I C T
aacaccaatgtgaagaactctagccaagaaccacggcctacactctccaacacaatccag
461- N T N V K N S S Q E P R P T L S N T I Q
aggccacaactaggtcccacagctaatttaccctggagatgggctcaggacagctggca
481- R P Q L G P T A N L P L E M G S G Q L A
cccaggcagcagcaacagcaaacagaattggacatggtaccaggaagagatggactggcc
501- P R Q Q Q Q Q T E L D M V P G R D G L A
agctacaatcattcccaggtggthttcagcctgtgacaaccacaggaccagaacacagcaag
521- S Y N H S Q V V Q P V T T T G P E H S K
ccccttgagaagtcagatggthtttggccaggatagagatccaagatthttcagaaatc
541- P L E K S D G L F A Q D R D P R F S E I
tatacacaacatcaatgcggatcagagtaaggcatctcctccagcactgtccctgccacc
561- Y H N I N A D Q S K G I S S S T V P A T
caacagctattctcccagggcaacacattcctcctacccccggccggcagagaatthttc
581- Q Q L F S Q G N T F P P T P R P A E N F
aggaatagtgccctagccccctcctgtaaccattgtccagccatcagcttctgcaggacag

```

601- R N S G L A P P V T I V Q P S A S A G Q
    atgttggcccagatttcccgcactccaacccccacccaaggagcaacccaacttggacc
621- M L A Q I S R H S N P T Q G A T P T W T
    cctactacccgctcaggccttttctgcccagcagggtggctacccaggctactgctaagact
641- P T T R S G F S A Q Q V A T Q A T A K T
    cgtacttcccagtttgggtgtgggcagctttcagactccatcctccttcagctccatgtcc
661- R T S Q F G V G S F Q T P S S F S S M S
    ctccctgggtgccccaaactgcatcgctgggtgctgctgcctaccctagtctcaccaatcgt
681- L P G A P T A S P G A A A Y P S L T N R
    ggatctaactttgctcctgagactggacagactgcaggacaattccagacacggacagca
701- G S N F A P E T G Q T A G Q F Q T R T A
    gagggtgtgggtgtctggccacagtgggcagggccagcagcctcatcatcgttcaagttct
721- E G V G V W P Q W Q G Q Q P H H R S S S
    agtgagcaacatgttcaacaaccgccagcacagcaacctggccagcctgaggtcctccag
741- S E Q H V Q Q P P A Q Q P G Q P E V F Q
    gagatgctgtccatgctgggagatcagagcaacagctacaacaatgaagaattccctgat
761- E M L S M L G D Q S N S Y N N E E F P D
    ctaactatgtttcccccttttcagaattag
781- L T M F P P F S E -
    ←

```

Figura 13. Seqüências de nucleotídeos (letras minúsculas) e aminoácidos (letras maiúsculas) do gene que codifica a subunidade β do HIF-1 (*arnt*). Oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para a enzima de restrição *Bam*HI (descritos na Tabela 4) foram sintetizados para amplificar a subunidade β do HIF-1 a partir do códon de iniciação da tradução até o códon do final da tradução. Os códons de iniciação (ATG) e terminação (TAG) da tradução estão destacados em negrito. As setas indicam as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos para amplificação do gene *arnt*. A seta localizada internamente na seqüência se refere à região de anelamento do oligonucleotídeo utilizado para a construção da versão truncada do ARNT. (■) região de aminoácidos básicos, (■) região *helix-loop-helix*, (■) domínio PAS-A, (■) domínio PAS-B.

Procedemos então com a ligação dos fragmentos correspondentes às subunidades do HIF-1 ao vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy (Promega). A bactéria da linhagem XL-1 Blue foi transformada com os sistemas de ligação. Em seguida, foi feita a seleção das colônias contendo insertos clonados no vetor pGEM[®]-T Easy. A seleção das colônias foi feita pelo ensaio de β -galactosidase em placas contendo X-gal e IPTG, ou seja, foram selecionadas as colônias brancas, pois o inserto interrompe a seqüência do gene *lacZ* que codifica para a enzima β -galactosidase, a qual metaboliza o X-gal a um componente azul. Após a seleção dos clones contendo as subunidades do HIF-1, procedemos com extração de DNA plasmidial em pequena escala. O perfil de digestão com a enzima de restrição *Bam*HI dos fragmentos clonados possibilitou a confirmação da presença dos insertos corretos e a seleção de clones positivos para serem usados na purificação de DNA e sequenciamento deste. Os resultados do sequenciamento de DNA mostraram que

ambos os genes das subunidades do HIF-1 clonados são idênticos à seqüências depositadas no GenBank confirmando a ausência de mutação.

2. Subclonagem dos genes das subunidades do HIF-1 em vetores de expressão de *S. cerevisiae*

Após a obtenção dos vetores pGEM[®]-T Easy recombinantes, ou seja, contendo os genes das subunidades do HIF-1, os fragmentos correspondentes aos genes HIF-1 α e ARNT foram purificados após terem sido excisados dos vetores recombinantes usando a enzima de restrição *Bam*HI. Os fragmentos contendo o sítio para a enzima de restrição *Bam*HI em suas extremidades foram subsequentemente clonados nos vetores de expressão da levedura *S. cerevisiae*, Y1PGK (possui o promotor da fosfoglicerato quinase, pPGK) e Y1GAL (possui o promotor da β -galactosidase, pGAL) (Xavier, 2003) que foram previamente digeridos com a enzima de restrição *Bgl*II. Os fragmentos de DNAs obtidos a partir das digestões com as enzimas *Bgl*II e *Bam*HI possuem extremidades compatíveis. As construções resultantes foram nomeadas de Y1PGK α , Y1PGK β , Y1GAL α e Y1GAL β . As estratégias de obtenção dos cassetes de expressão descritos acima estão esquematizadas nas Figuras 14 e 15. Os esquemas ilustrando a identificação dos vetores contendo os genes nas orientações corretas estão mostrados nas Figuras 16 e 17. As orientações dos genes nos vetores de expressão foram verificadas por análise de restrição com a enzima *Pst*I em gel de agarose (Figuras 18 e 19).

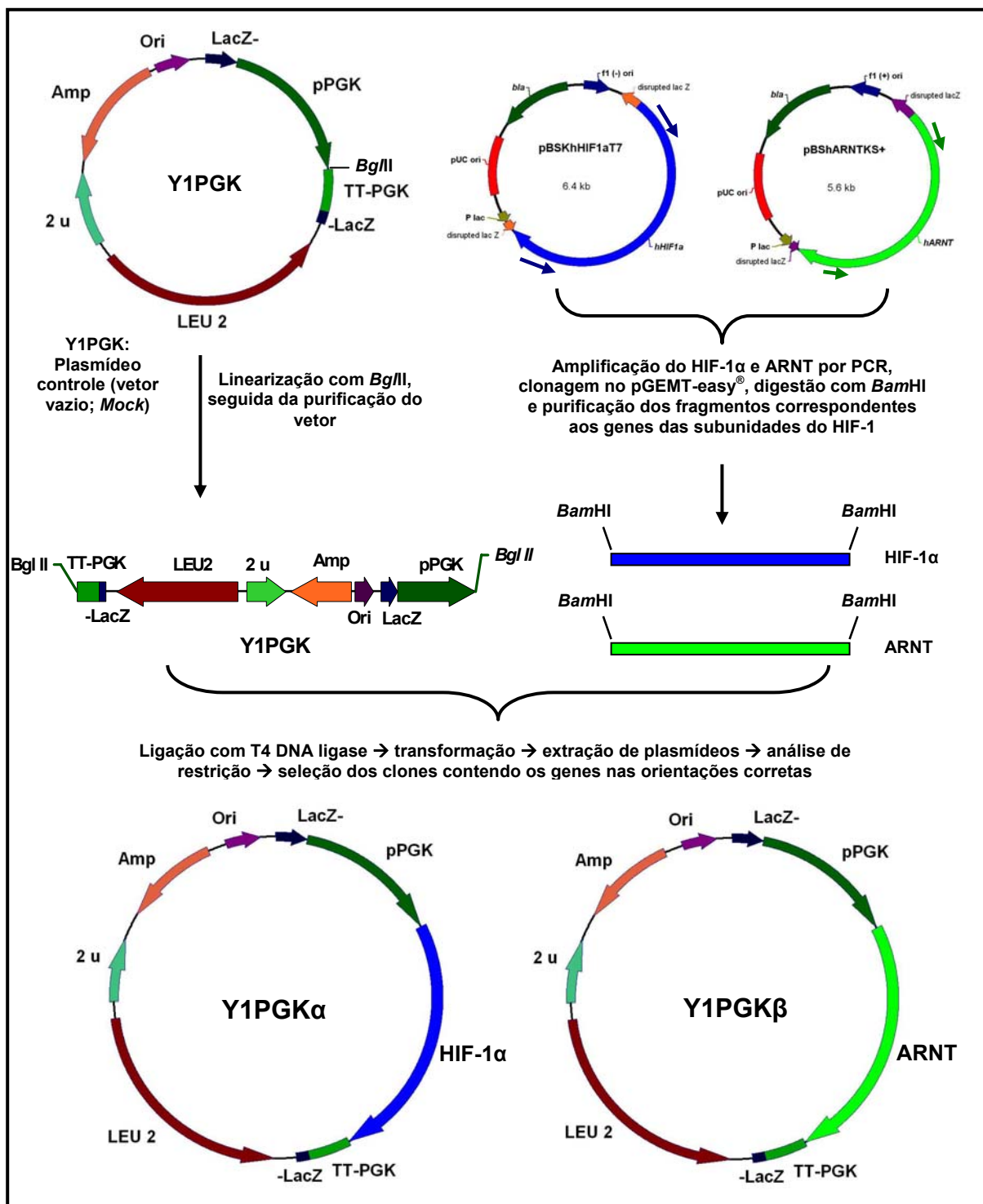


Figura 14. Representação esquemática das estratégias utilizadas para as construções dos vetores Y1PGK α e Y1PGK β . O vetor Y1PGK foi linearizado com a enzima de restrição *Bgl*III. Os produtos de PCR das subunidades do HIF-1 foram clonados no pGEMT-easy[®] e propagados em bactéria (XL-1 Blue). Em seguida os fragmentos liberados a partir das digestões dos vetores pGEM[®]-T Easy recombinantes (contendo HIF-1 α e ARNT) foram sub-clonados no vetor Y1PGK e os clones contendo os genes nas orientações corretas foram usados para transformar a levedura *S. cerevisiae*.

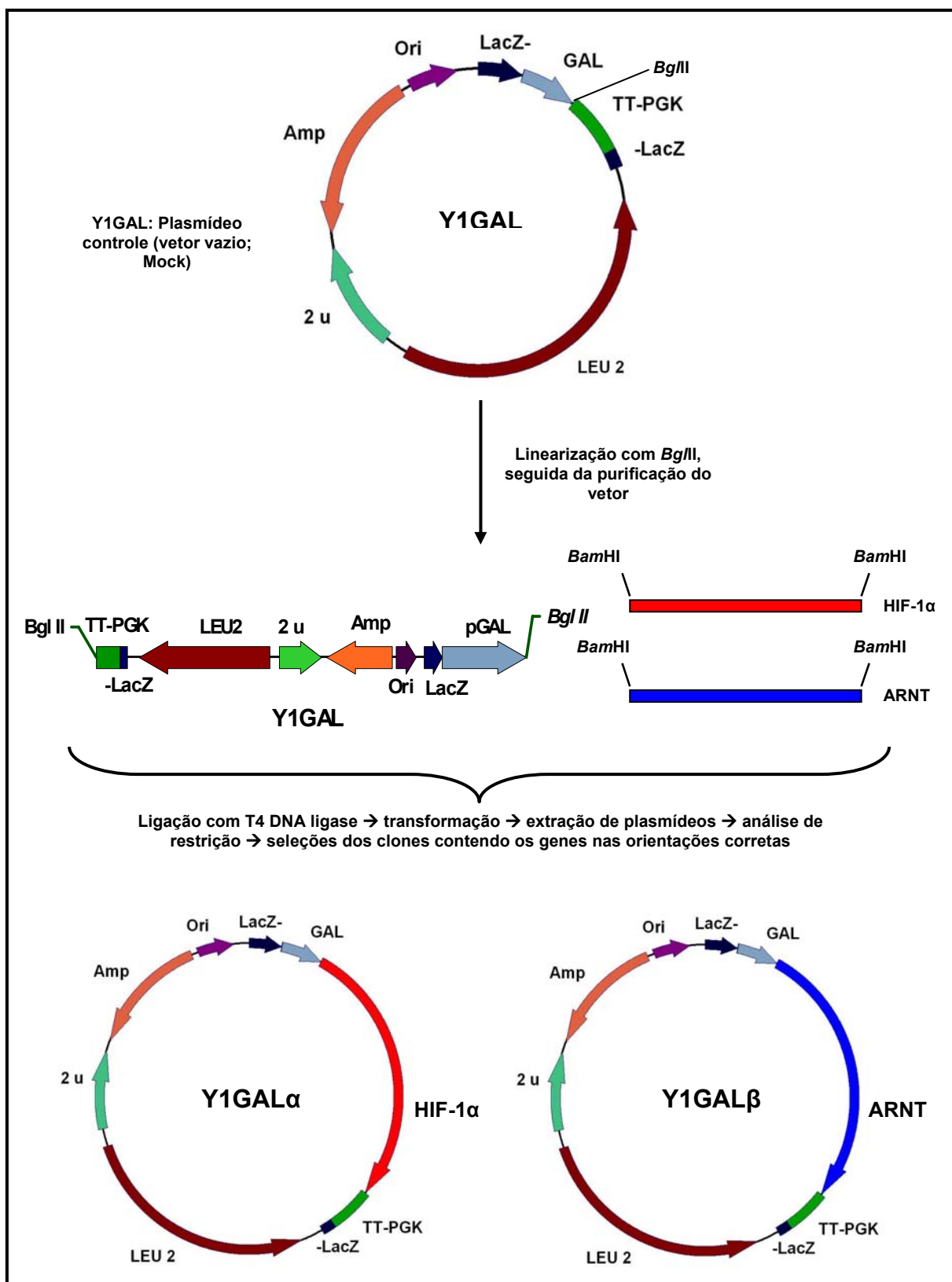


Figura 15. Representação esquemática das estratégias utilizadas para as construções dos vetores Y1GAL α e Y1GAL β . O vetor Y1GAL foi linearizado com a enzima de restrição *Bgl*II. Os produtos de PCR das subunidades do HIF-1 foram clonados no pGEMT-easy[®] e propagados em bactéria (XL-1 Blue). Em seguida os fragmentos liberados a partir das digestões dos vetores pGEM[®]-

T Easy recombinantes (contendo HIF-1 α ou ARNT) foram sub-clonados no vetor Y1GAL linearizado e os clones contendo o genes nas orientações corretas foram usados para transformar a levedura *S. cerevisiae*.

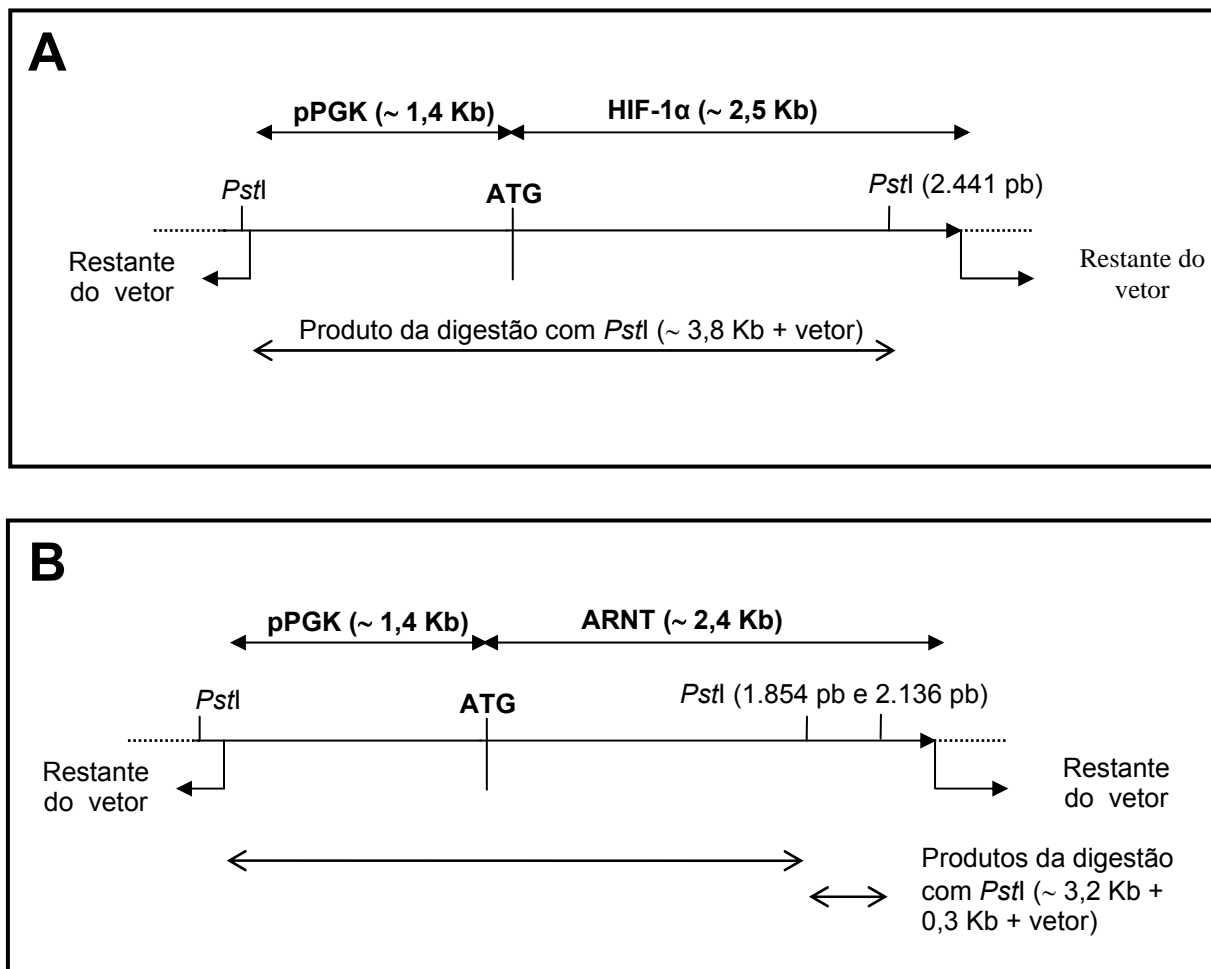


Figura 16: Esquema ilustrando os sistemas de digestão para identificação dos vetores contendo os genes do HIF-1 nas orientações corretas. Os vetores Y1PGK α (A) e Y1PGK β (B) foram digeridos com a enzima de restrição *Pst*I. Os tamanhos dos produtos esperados obtidos das digestões são de 3,8 Kb e 3,2 Kb para as construções PGK α e PGK β , respectivamente. Outros produtos das digestões estão descritos na Tabela 6.

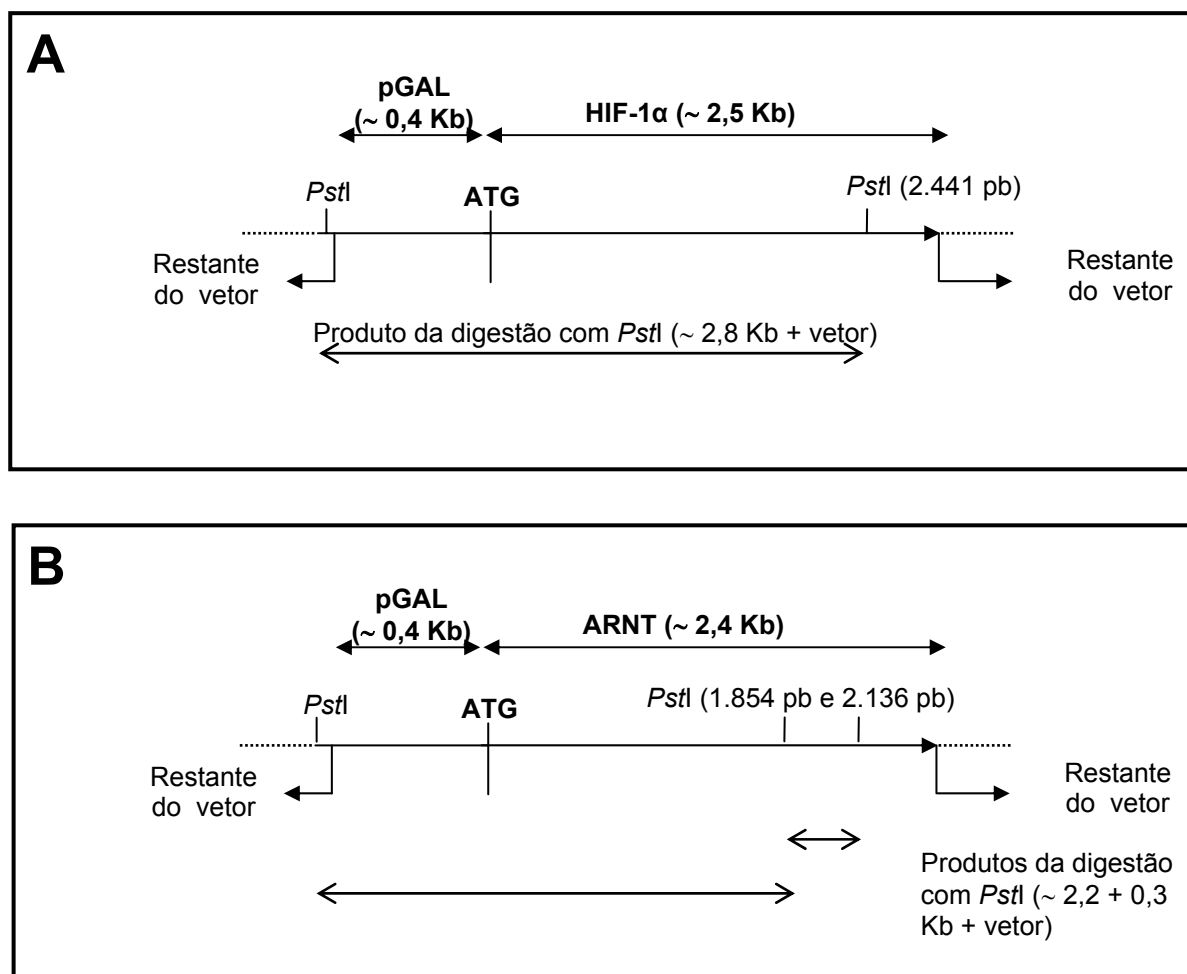


Figura 17: Esquema ilustrando os sistemas de digestão para identificação dos vetores contendo os genes do HIF-1 nas orientações corretas. Os vetores Y1GAL α (A) e Y1GAL β (B) foram digeridos com a enzima de restrição *PstI*. Os tamanhos dos principais produtos esperados obtidos das digestões são de 2,8 Kb e 2,2 Kb para as construções Y1GAL α e Y1GAL β , respectivamente. Outros produtos das digestões estão descritos na Tabela 6.

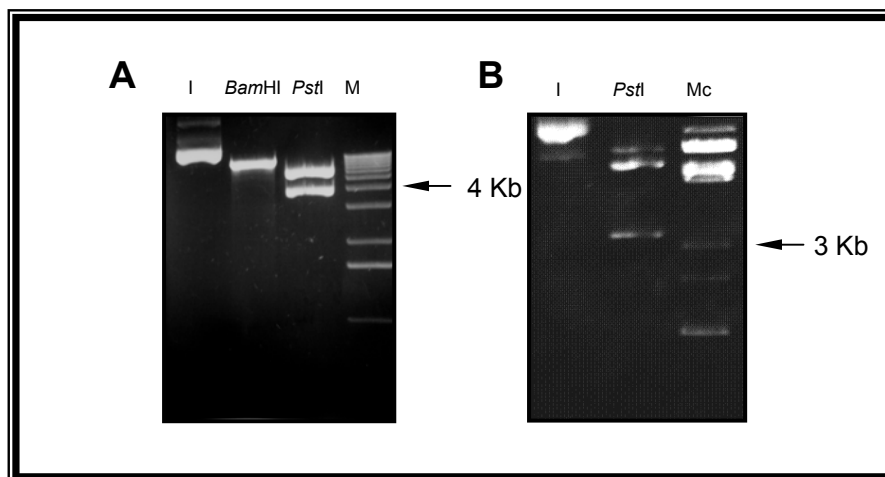


Figura 18. Análise de restrição dos cassetes de expressão Y1PGK α e Y1PGK β . Análise em gel de agarose 0,8% das orientações dos genes HIF-1 α (A) e ARNT (B) no vetor de expressão Y1PGK. Os fragmentos esperados a partir das digestões estão descritos na Tabela 7. I) vetor intacto; *Bam*HI) digestão com *Bam*HI; *Pst*I) digestão com *Pst*I; M) marcador de massa molecular 1 Kb *ladder* (Invitrogen[®]); Mc) Marcador caseiro (preparado no laboratório de Biologia Molecular pelo doutorando Túlio César).

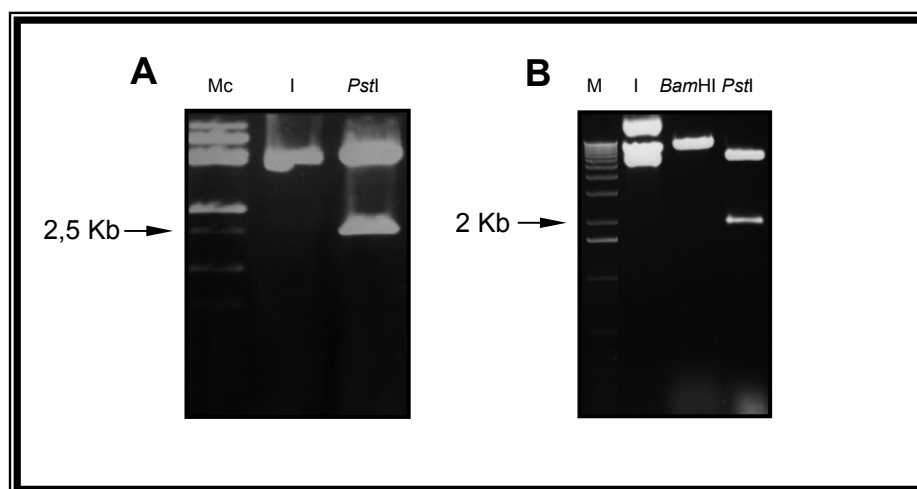


Figura 19. Análise de restrição dos cassetes de expressão Y1GAL α e Y1GAL β . Análise em gel de agarose 0,8% das orientações dos genes HIF-1 α (A) e ARNT (B) no vetor de expressão Y1GAL. Os fragmentos esperados a partir das digestões estão descritos na Tabela 7. I) vetor intacto; *Bam*HI) digestão com *Bam*HI; *Pst*I) digestão com *Pst*I; M) marcador de massa molecular 1 Kb *ladder* (Invitrogen[®]); Mc) Marcador caseiro (preparado no laboratório de Biologia Molecular pelo doutorando Túlio César).

No sentido de se obter um cassete de expressão com marca de seleção auxotrófica diferente da do vetor Y1PGK α , o qual possui o gene que participa na via de síntese de leucina (*LEU2*), foi utilizado o vetor Y2PGK que possui as mesmas características do Y1PGK, exceto que a marca de seleção auxotrófica é o gene que participa na via de síntese de uracila (*URA3*). Portanto, o cassete de expressão contendo o gene que codifica para o ARNT e com marca de seleção para URA3 foi nomeado de Y2PGK β . As estratégias utilizadas estão esquematizadas na Figura 20.

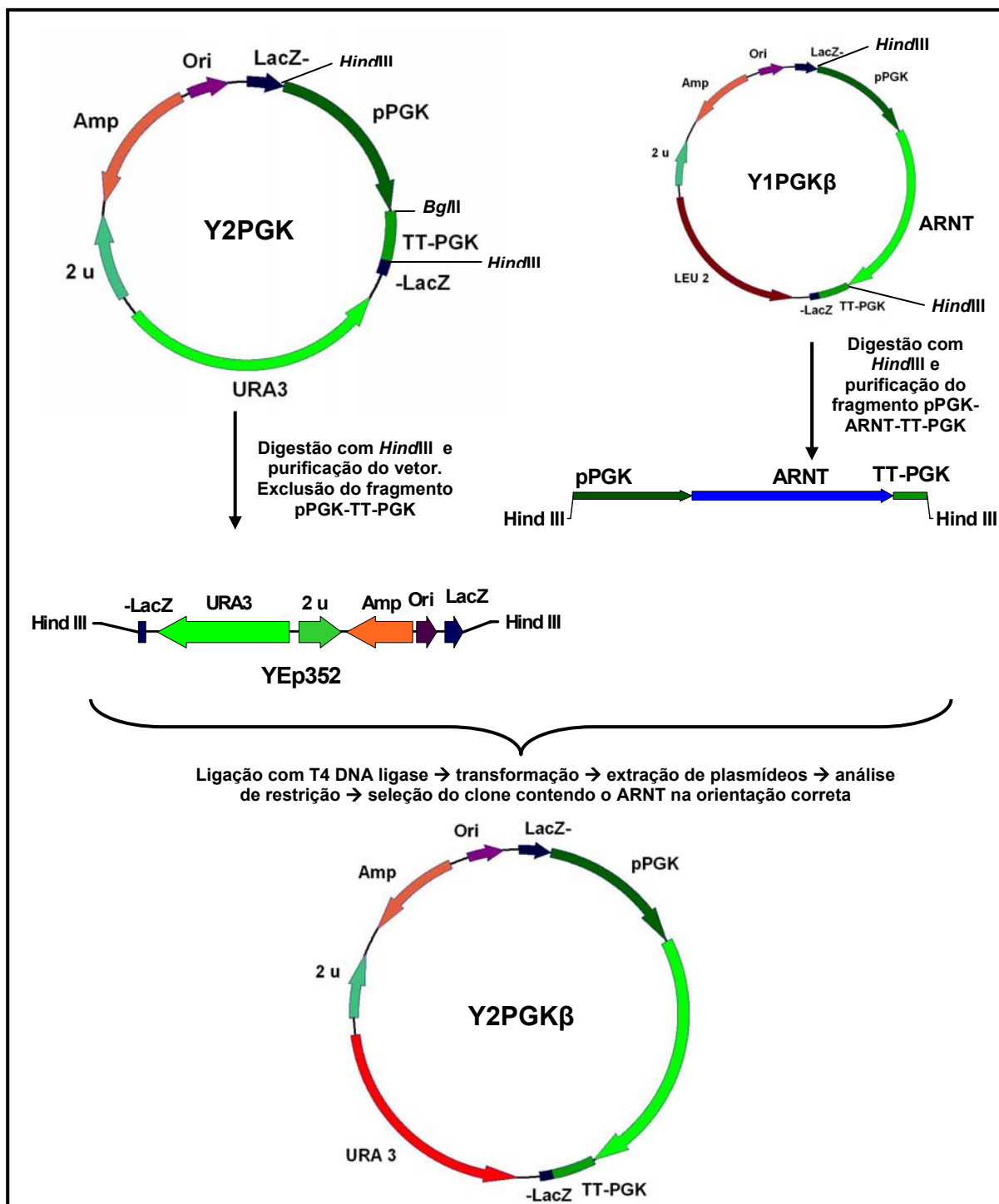


Figura 20. Representação esquemática das estratégias utilizadas para a construção do vetor Y2PGK β . Os vetores Y2PGK e Y1PGK foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII* e os fragmentos de interesse resultantes das digestões foram YE352 (vetor) e pPGK-ARNT-TT-PGK (inserto), respectivamente. O inserto contendo o ARNT foi então subclonado no vetor YE352, resultando assim no vetor de expressão Y2PGK β .

A orientação do gene *arnt* dentro do vetor Y2PGK foi verificada com a enzima de restrição *PstI* (dado não mostrado) de forma semelhante à construção Y1PGK β e

estava correta. Entretanto, não obtivemos sucesso em transformar células de leveduras com essa construção.

Apesar de termos inserido tanto o gene que codifica o HIF-1 α ou o ARNT no sítio de clonagem do vetor Y1GAL, ambos possuem a mesma marca de seleção auxotrófica *LEU2* e assim não podem ser usados juntos para produzir leveduras duplo-transformadas. Em adição a isso não obtivemos sucesso na construção de vetores recombinantes contendo HIF-1 α ou ARNT com marca auxotrófica diferente de *LEU2*, usando o vetor Y2GAL. Futuramente pretendemos obter novas construções utilizando marca de seleção auxotrófica diferente de *LEU2* e assim obter leveduras que expressam as subunidades α e β sob controle transcricional do promotor GAL.

As construções obtidas e os fragmentos esperados após digestão com enzimas de restrição estão esquematizados na Tabela 6. As construções obtidas contendo as subunidades do HIF-1 clonados nas orientações corretas foram utilizadas para transformar leveduras.

Tabela 6. Vetores obtidos após subclonagem das subunidades do HIF-1 nos vetores de expressão de *S. cerevisiae*. Estão relacionados os sistemas de ligação (vetores e insertos) e os tamanhos aproximados dos fragmentos principais esperados após digestão com a enzima de restrição *Pst*I para verificar as orientações dos genes dentro dos vetores de expressão.

Vetores	Sistema	Linear	<i>Pst</i> I
Y1PGK α	Y1PGK + HIF-1 α	~ 10,2 Kb	3,8 Kb + 6,4 Kb
Y1PGK β	Y1PGK + ARNT	~ 10 Kb	3,2 Kb + 6,5 Kb + 0,3 Kb
Y2PGK β	Y2PGK + ARNT	~ 9,5 Kb	3,2 Kb + 6,0 Kb + 0,3 Kb
Y1GAL α	Y1GAL + HIF-1 α	~ 9,1 Kb	2,8 Kb + 6,3 Kb
Y1GAL β	Y1GAL + ARNT	~ 9,0 Kb	2,2 Kb + 0,3 Kb + 6,5 Kb

3. Transformação de leveduras

Após a seleção dos vetores de expressão contendo os genes do HIF-1, primeiramente foram montados sistemas para transformar as linhagens de leveduras EG103, EG110 e EG118 com os vetores recombinantes Y1PGK α e Y1PGK β , isoladamente. Obtivemos transformantes para as linhagens EG103, EG110 e EG118, cada linhagem portanto expressando HIF-1 α ou ARNT. Após termos isolado algumas colônias das leveduras transformadas em meio seletivo novo (SC leu \bar{a} gar), algumas culturas foram crescidas em meio completo (YPD) durante a noite a partir de clones isolados e extratos protéicos foram preparados para detectar a expressão das subunidades α e β do HIF-1. As células foram sempre mantidas em meio seletivo até o momento de inoculá-las em meio YPD para preparação de extratos protéicos. Isso foi feito para evitar que as células perdessem os plasmídeos.

4. Western blotting para a subunidade HIF-1 α

Vários clones de cada linhagem transformada foram analisados através de experimentos de Western Blot para detectar a expressão do HIF-1 α . Duzentos microgramas de extrato protéico de cada linhagem (EG103, EG110 e EG118) foram aplicados em gel de SDS-PAGE. Extratos de células transformadas com o vetor Y1PGK (controle *mock*) e extratos de células não transformadas foram utilizados como controles negativos. Cinco microlitros de extrato nuclear de células HeLa submetidas à condição de hipóxia (1% de oxigênio, 37°C, 16 horas) foram usados como controles positivos, já que a subunidade HIF-1 α é expressa em abundância nestas células sob condições de hipóxia. Após a transferência para uma membrana de nitrocelulose, a expressão da subunidade HIF-1 α nas diferentes linhagens de leveduras foi analisada. Western Blots foram feitos utilizando-se o anticorpo policlonal obtido a partir da imunização da gema de ovo de galinha, IgY anti-HIF-1 α . Como podemos observar na Figura 21 (painéis A e B), os controles positivos (extrato nuclear de células HeLa submetidas à hipóxia) apresentaram sinais do tamanho esperado de aproximadamente de 116 kDa (indicados pelas setas) e as amostras EG103 (painel A, amostras 2, 5, 6, 8 e 9), EG110 (painel B, amostras 2, 3 e 4),

embora com sinais fracos e EG118 (painel B, amostras 1, 2, 3, 5 e 6) apresentaram sinais que correspondem ao tamanho esperado do HIF-1 α . As linhagens transformadas com o gene HIF-1 α foram nomeadas EG103 α , EG110 α e EG118 α . Algumas transformantes não apresentaram sinais para a expressão do HIF-1 α , com pode ser observado na Figura 21.

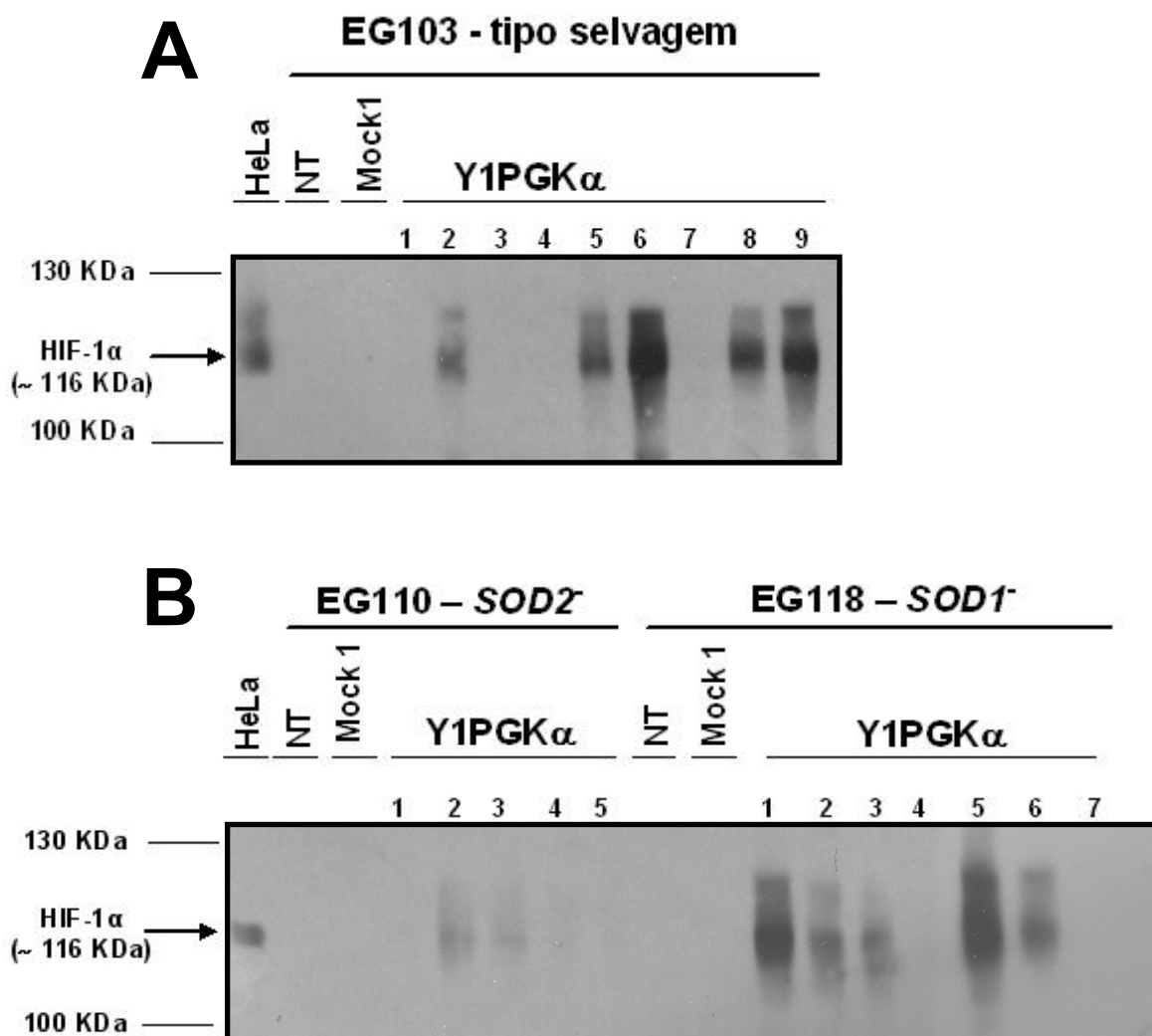


Figura 21. Western blot para detecção do HIF-1 α . **A)** EG103 (tipo selvagem); **B)** EG110 (*SOD2*) e EG118 (*SOD1*). Células das linhagens EG103, EG110 e EG118, foram transformadas com o vetor Y1PGK α e 200 μ g dos extratos protéicos de vários clones de cada transformante foram analisados (EG103: 1 a 9; EG110: 1 a 5 e EG118: 1 a 7). Foi usado o anticorpo policlonal de gema de ovo de galinha (IgY) anti-HIF-1 α . Extratos de células não transformadas (NT) e extratos de células transformadas com o vetor vazio Y1PGK (*Mock 1*) foram usados como controles negativos. Cinco micrograma de extrato nuclear de células HeLa submetidas a condições de hipóxia, 1% O₂ foram usados como controle positivo. Massas moleculares de 100 kDa e 130 kDa se referem ao marcador de massa molecular de proteína BenchMarker PreStained (Invitrogen[®]).

No sentido de verificar se o padrão de migração do HIF-1 α recombinante em gel de poliacrilamida desnaturante e a sua estabilidade são afetados pelos níveis de oxigênio em leveduras, nós verificamos a expressão dessa proteína em células de leveduras cultivadas sob diferentes níveis de oxigênio. Em algumas amostras de extratos protéicos derivados de células crescidas em hipóxia foi verificado um nível de expressão maior em relação à amostra EG103 α (crescimento sob normóxia). No entanto, isso não indica que em normóxia o HIF-1 α expresso está sendo degradado e/ou possui uma expressão menos eficiente. Os resultados da Figura 21 corroboram com essa hipótese/afirmação, já que os extratos analisados nesse experimento também são derivados de células crescidas em condições normais, onde foram observados altos níveis de expressão do HIF-1 α . Baseado nos resultados da Figura 22, nós observamos que a estabilidade e o padrão de migração do HIF-1 α em gel de poliacrilamida não foram alterados, pois o mesmo padrão foi encontrado em extratos provenientes de células de leveduras recombinantes crescidas em normóxia e hipóxia e extrato nuclear de células HeLa humanas crescidas em hipóxia por 16 h. Isso indica que os estudos com o HIF-1 α na levedura poderá ser feito em condições normais de oxigênio.

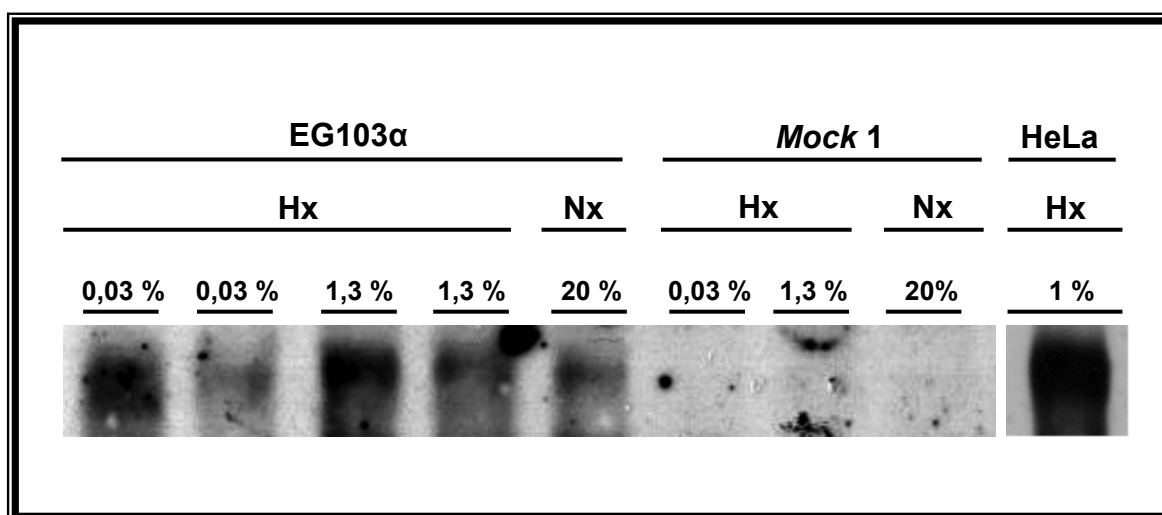


Figura 22. Western blot para a detecção do HIF-1 α em condições de normóxia (Nx) e hipóxia (Hx). Extratos protéicos da linhagem EG103 α crescida sob condições de normóxia (20 % O₂) e hipóxia (9,72 mmHg e 0,3 mmHg, aproximadamente 1,3 % O₂ e 0,03 % O₂, respectivamente) foram analisados quando a presença de HIF-1 α humano em experimentos de Western Blot. 200 μ g dos extratos protéicos foram fracionados em gel de poliacrilamida e a imunodeteccção foi feita usando-se o anticorpo policlonal IgY anti-HIF-1 α . Controle negativo (linhagem transformada com o vetor vazio,

Mock 1): Controle positivo (extrato de células HeLa submetidas a condições de hipóxia, 1% O₂, por 16 horas). Extratos de células submetidas à hipóxia foram analisados em duplicata.

Para proceder com as transformações das linhagens que expressam o HIF-1 α com o vetor de expressão Y2PGK β e obter linhagens duplo-transformadas, foram utilizadas as amostras EG103 (Figura 21, amostra 6, painel A) e EG110 (Figura 21 amostra 2, painel B). Não utilizamos a linhagem EG118, pois de acordo com seu genótipo essa linhagem foi engenheirada de forma que o gene da enzima superóxido dismutase (*SOD1*) foi interrompido com o gene que corresponde à marca de seleção URA3 (*MATa leu2 his3 trp1 sod1 Δ ::URA3*), portanto, não tínhamos como usar o vetor Y2PGK β para transformar essa linhagem, cuja marca de seleção auxotrófica é o URA3. Após várias tentativas de transformações das EG103 α e EG110 α com o vetor Y2PGK β não conseguimos obter células duplo-transformantes. Apesar das análises feitas terem confirmado que de fato o vetor utilizado era o Y2PGK β , não obtivemos células transformadas, mesmo utilizando como controles as linhagens não transformadas com o HIF-1 α (EG103 e EG110).

No sentido de obtermos linhagens que co-expressem HIF-1 e ARNT, adquirimos o vetor pY2ARNT com o Dr. Christopher Bradfield (Madison, USA). Esse vetor também possui o ARNT sob controle transcricional do gene da PGK, mas com marca de seleção auxotrófica para o gene que participa da via de síntese do triptofano (*TRP1*). Obtivemos vários transformantes para a linhagem EG103. Não utilizamos a linhagem EG110, pois o seu genótipo é *MATa leu2 his3 trp1 sod2 Δ ::TRP1*, ou seja, o gene que codifica para a superóxido dismutase 2 (*SOD2*) foi interrompido com o gene *TRP1*. Portanto, não tínhamos como usar o vetor pY2ARNT para transformar essa linhagem. Nenhum transformante da linhagem EG118 foi obtido, pois, das várias tentativas, nenhum clone cresceu em meio seletivo. Os experimentos subsequentes foram conduzidos usando apenas a linhagem EG103 (recombinantes e tipo selvagem).

5. Western blotting para a subunidade ARNT.

Nós inicialmente analisamos a expressão do ARNT nas linhagens de leveduras transformadas somente com a construção Y1PGK β (Figura 23) usando o anticorpo monoclonal de camundongo, anti-ARNT (AbCam). As células transformadas com o vetor contendo o ARNT expressaram eficientemente essa proteína e foram então nomeadas EG103 β , EG110 β e EG118 β . Embora não tenhamos usado essas linhagens nesse trabalho, elas poderão ser utilizadas em experimentos futuros.

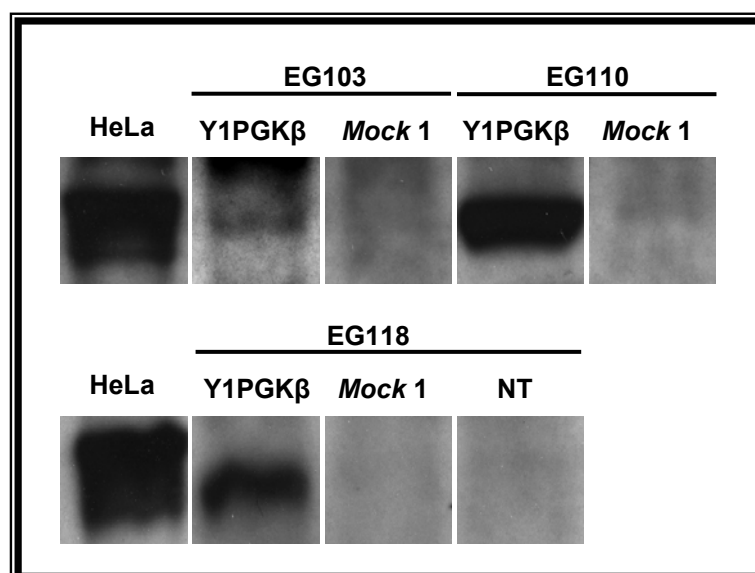


Figura 23. Western blot para a detecção do ARNT nas linhagens transformadas somente com o vetor Y1PGK β . Células das linhagens EG103, EG110 e EG118 foram transformadas com o vetor Y1PGK β e colônias isoladas das linhagens transformantes foram selecionadas para se verificar a expressão do ARNT. As células foram crescidas sob condições de normóxia. Células não transformadas (NT) e transformadas com o vetor vazio (Y1PGK, *Mock 1*) foram usadas como controles negativos. 200 μ g dos extratos protéicos de leveduras foram aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida 7,5 %. 5 μ g de extrato nuclear de células HeLa submetidas a hipóxia (1% O₂) foram usados como controle positivo. Foi usado o anticorpo monoclonal de camundongo anti-ARNT (AbCam).

Em seguida a linhagem EG103 α (Figura 21, painel A, amostra 6) transformada com o vetor pY2ARNT foi utilizada para analisar a expressão do

ARNT. Antes de proceder com o crescimento das células em meio completo YPD, vários clones foram semeados novamente em meio mínimo (SC) sem leucina e triptofano para isolar somente células contendo as duas marcas seletivas. A linhagem EG103 α co-expressa o ARNT (87 kDa a 94 kDa) como pode ser verificado na Figura 24. Uma vez que a expressão do ARNT foi confirmada, a expressão do HIF-1 α foi mais uma vez verificada (dado não mostrado). A linhagem que expressa ambos HIF-1 α e ARNT foi nomeada de EG103 $\alpha\beta$.

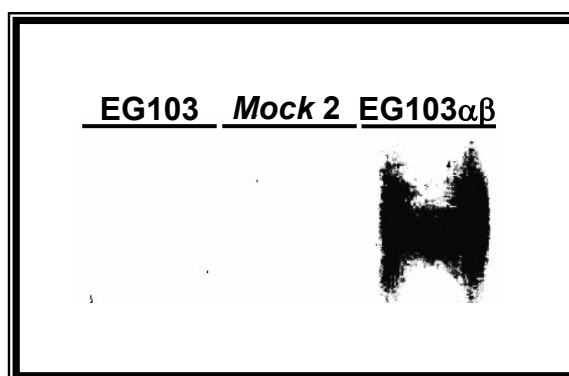


Figura 24. Western blot para detecção do ARNT na linhagem EG103 α transformada com o vetor pY2ARNT. Células das linhagens EG103 α foram transformadas com o vetor pY2ARNT e colônias isoladas da linhagem transformante foram selecionadas para se verificar a expressão do ARNT. As células foram crescidas em condições de normóxia. Células não transformadas (EG103) e transformadas com o vetor vazio (*Mock 2*) foram usadas como controles negativos. 200 μ g dos extratos protéicos de leveduras foram aplicados em gel de poliácridamida desnaturante 7,5%. Foi usado o anticorpo policlonal de coelho anti-ARNT.

6. Obtenção da versão truncada do gene que codifica para o ARNT

Para obtermos a versão truncada do gene que codifica para o ARNT, amplificamos o ARNT pela técnica de PCR usando um par de oligonucleotídeos, um *antisense* e um *sense* (Tabela 4, oligonucleotídeos tARNT-F e ARNTR-1 e Figura 13), o último se anela após o domínio bHLH desse gene. O tamanho do fragmento esperado era de 1.953 pb (Figura 25).

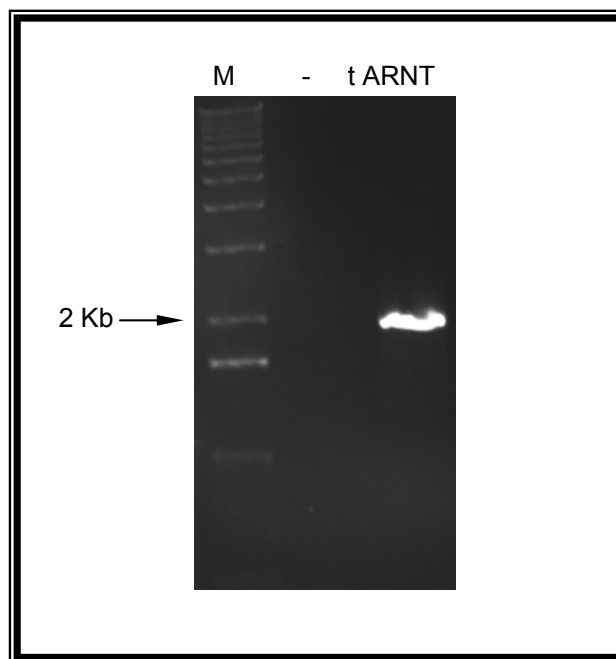


Figura 25. Amplificação do gene *hif-1 β* (ARNT) para obtenção de sua versão truncada. Análise dos produtos da PCR em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídeo. Nas reações foi usada a enzima *Taq polimerase* (Cenbiot[®]). M) marcador de massa molecular 1 Kb ladder (Invitrogen[®]). -) reação sem DNA molde e tARNT) reação contendo 1 ng do plasmídeo pBShARNTKS⁺ como DNA molde.

Assim, o gene ARNT truncado foi clonado em pGEM[®]-T Easy e posteriormente subclonado no vetor de expressão pYPGE2, cuja marca de seleção auxotrófica é o *TRP1* (estratégia de subclonagem ilustrado na Figura 26). A orientação do gene tARNT no vetor de expressão pYPGE2 foi verificada em gel de agarose através da análise do perfil de restrição usando as enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRI*. O esquema ilustrando a identificação do clone contendo o gene na orientação correta está mostrado na Figura 27 e os produtos obtidos das digestões estão mostrados na Figura 28. Os tamanhos dos fragmentos esperados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Vetor obtido após subclonagem da subunidade truncada do ARNT no vetor de expressão de *S. cerevisiae*. Estão relacionados o sistema de ligação (vetor e inserto) e os tamanhos aproximados dos fragmentos principais esperados após digestão com as enzimas de restrição *KpnI* e *EcoRI* para verificar as orientações do gene dentro do vetor de expressão.

Vetor	Sistema	Linear	<i>KpnI</i>	<i>EcoRI</i>
PYtARNT	pYPGE2 + tARNT	~ 7,6 Kb	1,1 Kb + 6,5 Kb	0,8 Kb + 1,1 Kb + 5,7 Kb

A estratégia utilizada para obtenção do vetor contendo a versão truncada do ARNT está esquematizada na Figura 26.

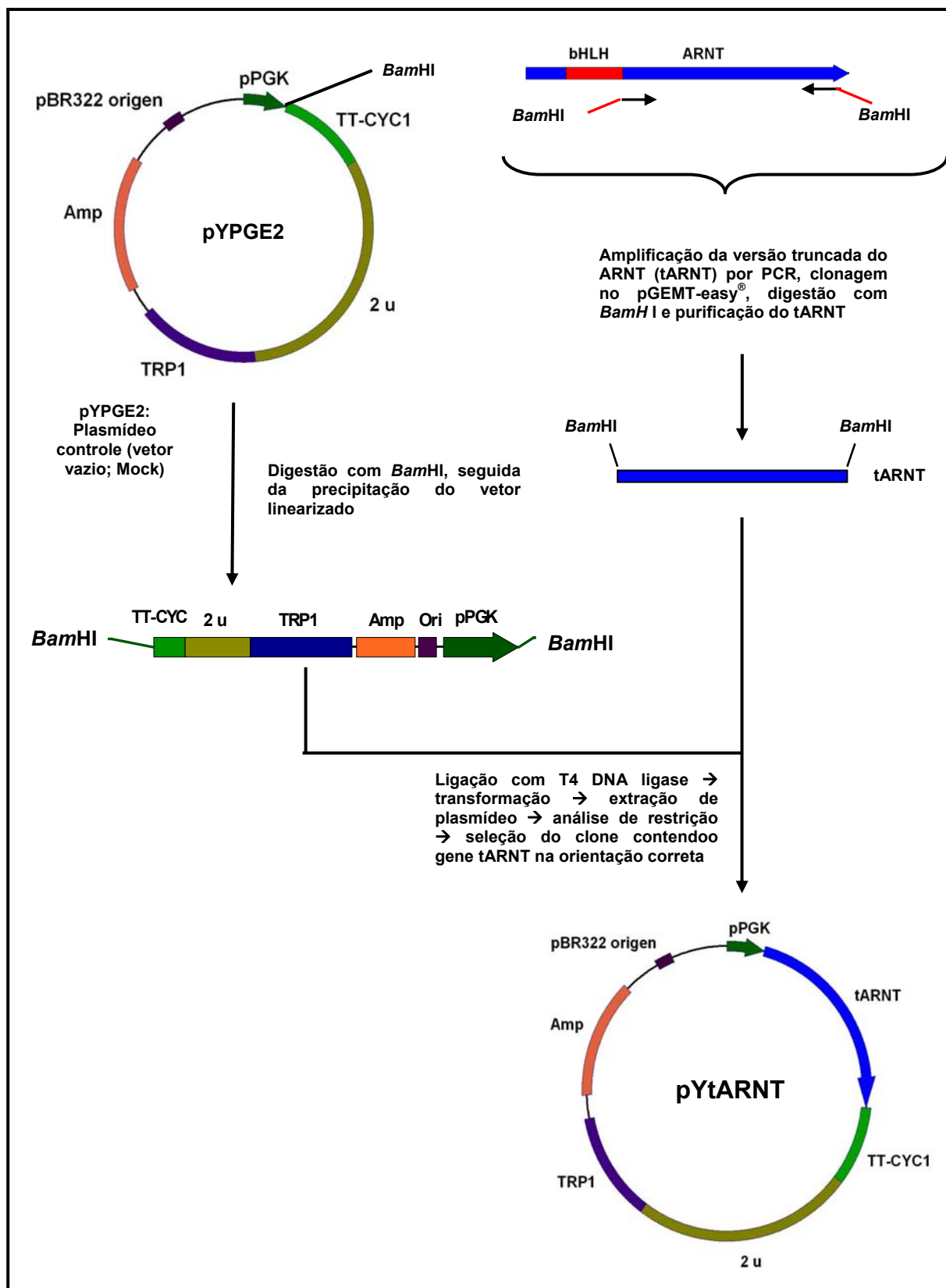


Figura 26. Representação esquemática das estratégias utilizadas para a construção do vetor pYtARNT. O vetor pYPGE2 foi linearizado com a enzima de restrição *Bam*HI. O produto de PCR da subunidade truncada do ARNT foi clonado no pGEMT-easy[®] e propagado em bactéria (XL-1 Blue).

Em seguida o fragmento liberado a partir da digestão do vetor pGEM[®]-T Easy recombinante (contendo o tARNT) foi sub-clonado no vetor pYPGE2 e o clone contendo o gene na orientação correta foi usado para transformar a levedura *S. cerevisiae*.

A orientação do gene tARNT dentro do vetor foi verificada através do perfil de digestão com as enzimas de restrição *Kpn* I e *EcoR* I (Figura 28).

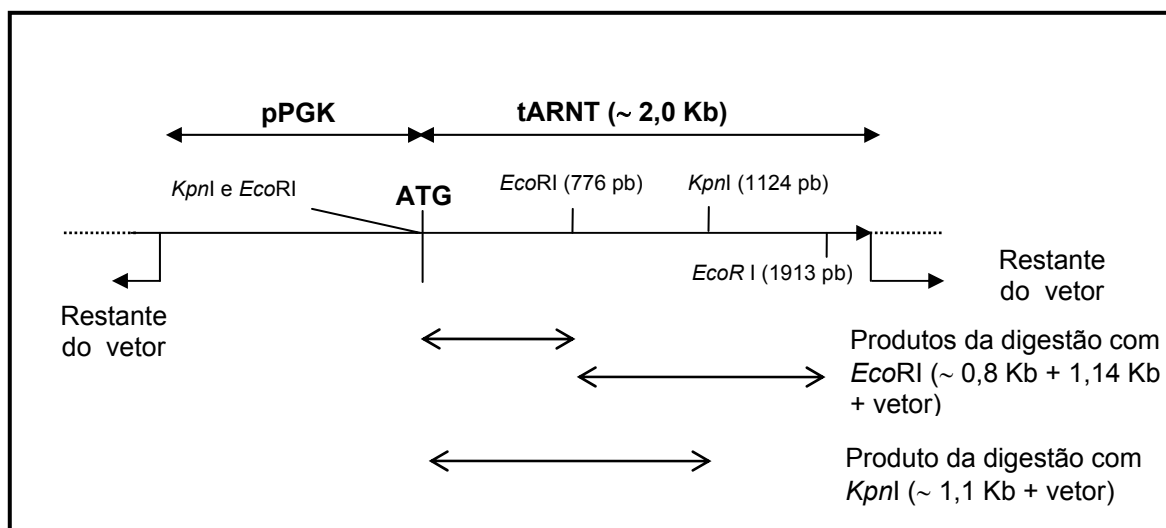


Figura 27: Esquema ilustrando o sistema de digestão para a identificação do vetor contendo a versão truncada do gene *arnt* na orientação correta. O vetor pYtARNT foi digerido com as enzimas de restrição *Kpn*I e *Eco*RI. Os tamanhos dos principais produtos esperados obtidos das digestões estão descritos na tabela 7.

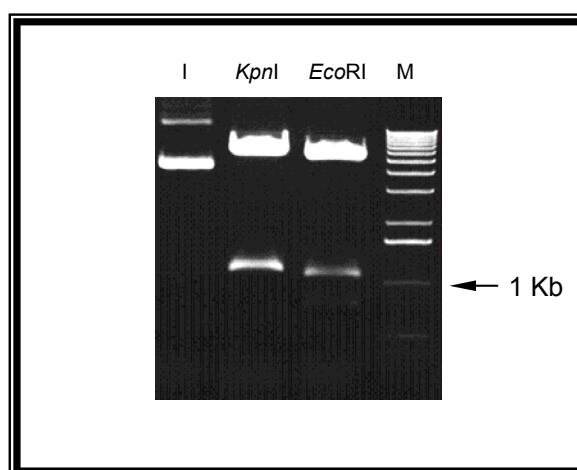


Figura 28. Análise de restrição do vetor pYtARNT. Análise em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídeo das digestões do vetor pYtARNT com as enzimas *Kpn*I e *Eco*RI. Os tamanhos dos fragmentos esperados a partir das digestões estão descritos na Tabela 7. I) vetor intacto; *Kpn*I)

digestão com *KpnI*; *EcoRI*) digestão com *EcoRI*; M) marcador de massa molecular 1 Kb *ladder* (Invitrogen®).

Em resumo, nesse trabalho obtivemos várias linhagens recombinantes que expressam as subunidades do HIF-1, HIF-1 α e/ou o ARNT. As linhagens recombinantes e as linhagens controles obtidas neste estudo estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Linhagens de leveduras obtidas nesse trabalho. A expressão do HIF-1 α e ARNT foi detectada nas linhagens recombinantes através de ensaios de Western Blot. Linhagens não transformadas ou transformadas apenas com os vetores vazios (células *mock*) foram usadas como controles negativos dos ensaios.

Linhagem	Vetores de expressão	Observação
EG103WT (Tipo selvagem)	Não Transformada	Controle negativo
EG103M1(Mock 1)	Y1PGK	Controle negativo
EG103 α	Y1PGK α	Expressão do HIF-1 α confirmada
EG103 β	Y1PGK β	Expressão do ARNT confirmada
EG103M2 (Mock 2)	Y1PGK + pYPGE2	Controle negativo
EG103 $\alpha\beta$	Y1PGK α + pY2ARNT	Expressões do HIF-1 α e ARNT confirmadas
EG103 $\alpha\beta$	Y1PGK α + pYtARNT	Expressão do HIF-1 α confirmada e tARNT não confirmada
EG110WT (Tipo selvagem)	Não Transformada	Controle negativo
EG110M1 (Mock 1)	Y1PGK	Controle negativo
EG110 α	Y1PGK α	Expressão do HIF-1 α confirmada
EG110 β	Y1PGK β	Expressão do ARNT confirmada
EG118WT (Tipo selvagem)	Não Transformada	Controle negativo
EG118M1 (Mock 1)	Y1PGK	Controle negativo
EG118 α	Y1PGK α	Expressão do HIF-1 α confirmada
EG118 β	Y1PGK β	Expressão do ARNT confirmada

7. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

No sentido de investigar se as duas subunidades do HIF-1 expressas em leveduras são capazes de se ligar à seqüência específica de reconhecimento no DNA nós fizemos experimentos de EMSA. Como mostra a Figura 29, o oligonucleotídeo de 18 pares de bases W18, derivado do *enhancer* localizado na

região 3' do gene da eritropoietina humana foi reconhecido por proteínas presentes nos extratos derivados da linhagem EG103 $\alpha\beta$. O reconhecimento e ligação a esse oligonucleotídeo foram abolidos quando usamos amostras de células que expressam a versão completa do HIF-1 α e a versão truncada do ARNT (EG103 $\alpha\beta$) (dados não mostrados). A versão truncada do ARNT foi construída de maneira que ela é incapaz de formar o heterodímero com o HIF-1 α e reconhecer e se ligar ao motivo HRE. Portanto, os resultados indicam que as subunidades do HIF-1 expressas em leveduras são as proteínas formadoras do complexo DNA-proteína observado nas amostras da linhagem EG103 $\alpha\beta$. Além do complexo de ligação específico observado somente nas amostras derivadas da linhagem EG103 $\alpha\beta$ um produto de ligação foi detectado nas outras amostras (extratos de células não transformadas ou transformadas com o vetor vazio). Ambos produtos de ligação foram desfeitos usando um excesso molar de 250X do oligonucleotídeo W18 não marcado radioativamente, indicando que leveduras possuem proteínas endógenas que reconhecem o motivo HRE com uma afinidade similar ao HIF-1 (dado não mostrado).

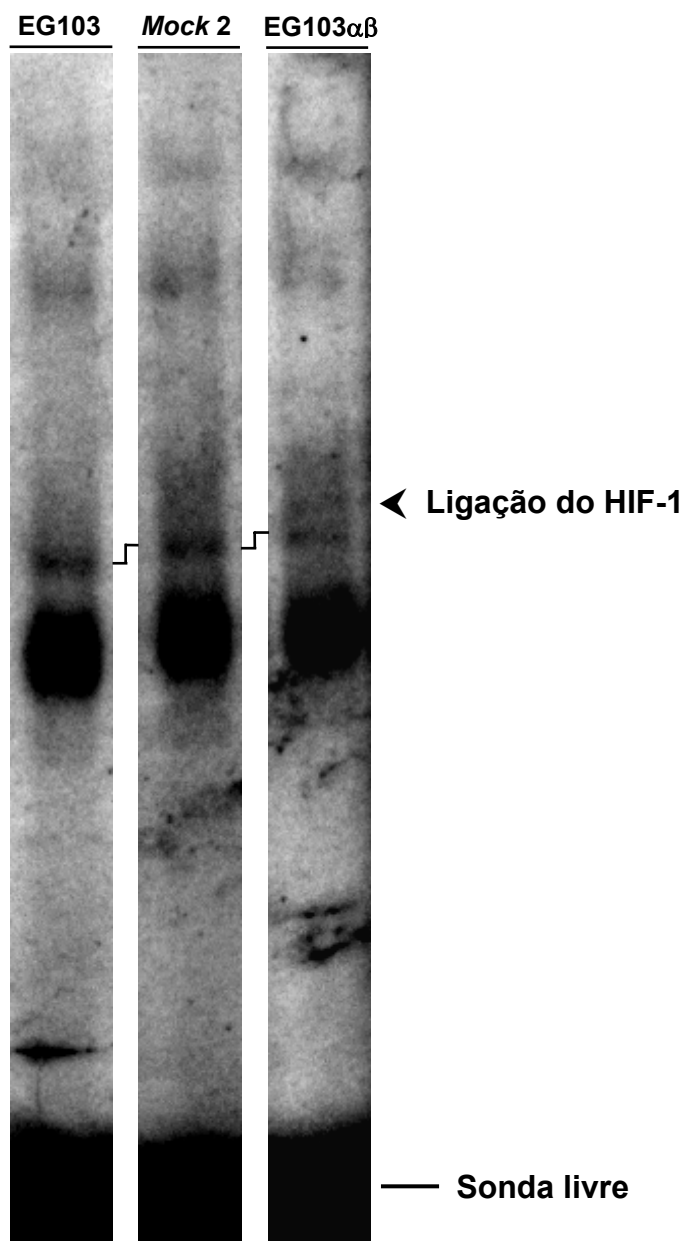


Figura 29. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA) foi feito usando a sonda EPO marcada radioativamente em gel de poliacrilamida 5% nativo. Cada reação continha 150.000 cpm da sonda EPO, 0,3 μ g de poli (dI-dC) e 50 μ g de extrato protéico total de leveduras crescidas sob condições normais de oxigênio. A fonte de extrato total de levedura está indicada: EG103 (tipo selvagem, não transformada); *Mock2* (transformada com os vetores vazios pYPGE2 e Y1PGK) e EG103 $\alpha\beta$ (EG103 transformada com Y1PGK α e pY2ARNT). O experimento foi repetido duas vezes.

8. Curva de crescimento

Já é bem descrito na literatura que o HIF-1 é um fator de transcrição envolvido na regulação gênica de vários processos celulares, incluindo o seu envolvimento na sobrevivência/crescimento celular e também apoptose. A partir das análises de bioinformática onde encontramos possíveis HREs em vários promotores de genes de leveduras (Tabela 10, página 106) e a atividade ligante de HIF-1 observada em ensaios de EMSA (Figura 31, página 100), nós especulamos se o HIF-1 expresso em leveduras poderia se ligar a alguma região promotora de um possível HRE funcional encontrado nos genes de leveduras e assim levar a alguma alteração no seu crescimento celular. Para isso, medimos o crescimento das células em meio mínimo até que as culturas atingissem a fase estacionária (Figura 30). Nas primeiras seis horas de crescimento as culturas apresentaram uma taxa de crescimento similar, ou seja as densidades óticas das amostras apresentaram valores sem diferença estatística (OD600: EG103WT = $0,1165 \pm 0,0055$; EG103M2 = $0,0815 \pm 0,0015$; EG103 $\alpha\beta$ = $0,073 \pm 0,0065$ e EG103 $\alpha\beta$ = $0,0845 \pm 0,005$), embora a amostra EG103WT tenha apresentado uma taxa de crescimento maior em relação as outras amostras. No entanto, após 54 h de cultivo, as culturas EG103M2 e EG103 $\alpha\beta$ apresentaram diferença no crescimento com $p < 0,05$ (Teste Anova seguido Student Newman-Keuls test).

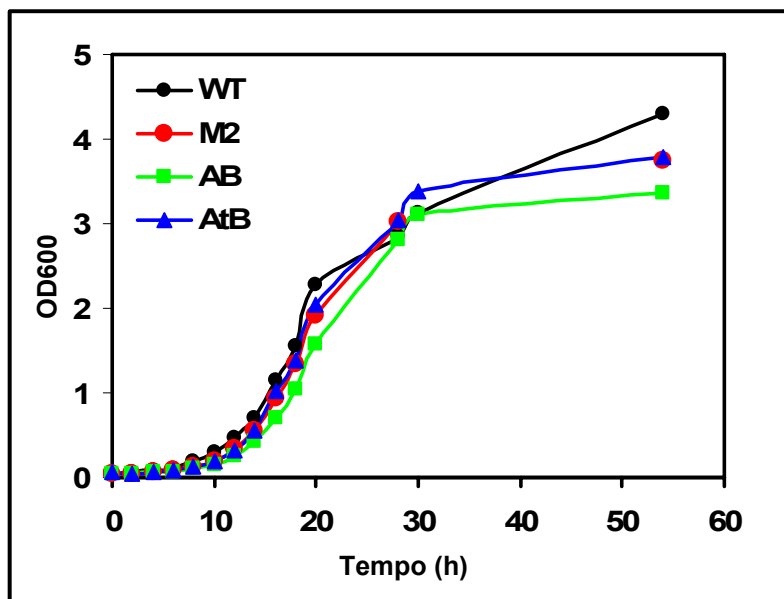


Figura 30. Curva de crescimento das culturas de leveduras. Culturas de células EG103WT, EG103M2, EG103 $\alpha\beta$ e EG103 $\alpha\beta$ crescidas durante a noite foram inoculadas em 30 mL de meio mínimo novo para uma densidade ótica (OD600nm) inicial de 0,05. Periodicamente alíquotas de cada cultura foram retiradas e as OD600nm foram medidas e registradas. O gráfico mostra dados oriundos de dois experimentos independentes feitos no mesmo dia. O experimento foi repetido três vezes em dias diferentes com resultados semelhantes.

Para verificarmos se essa diferença no crescimento poderia ser causada por uma maior demanda da maquinaria de síntese protéica nas células duplo-transformadas e não por um efeito direto do HIF-1, testamos células transformadas com o gene para a subunidade HIF-1 α e o gene truncada para a o ARNT. Embora as culturas EG103M2 e EG103 $\alpha\beta$ tenham apresentado padrões de crescimentos idênticos (valores de p não significativamente diferentes), verificamos que não houve diferença significativa entre as culturas EG103 $\alpha\beta$ e EG103 $\alpha\beta$ (OD600 após 54 horas de crescimento: EG103M2 = $3,735 \pm 0,005$; EG103 $\alpha\beta$ = $3,36 \pm 0,12$ e EG103 $\alpha\beta$ = $3,78 \pm 0,07$). Esses resultados indicam que as diferenças observadas não se devem ao fato de que o dímero de HIF-1 esteja exercendo algum efeito regulatório em genes de leveduras. Acreditamos que as diferenças observadas no crescimento se devem unicamente ao fato de que as células estejam desviando sua maquinaria celular basal para a síntese de proteínas heterólogas.

9. Detecção da ligação de proteínas endógenas de leveduras ao DNA

Para investigar se alguma proteína endógena de levedura reconhece e se liga ao motivo HRE derivado do *enhancer* 3' do gene da eritropoietina humana, fizemos experimentos de EMSA usando extratos de leveduras submetidas a condições de normóxia e hipóxia (Figura 31). Verificamos que leveduras possuem proteínas capazes de se ligar ao HRE de EPO humana sob condições de normóxia e hipóxia. Além disso, nas amostras submetidas à hipóxia houve uma banda induzida (1,6 vezes) relativa à mesma banda na amostra submetida à normóxia.

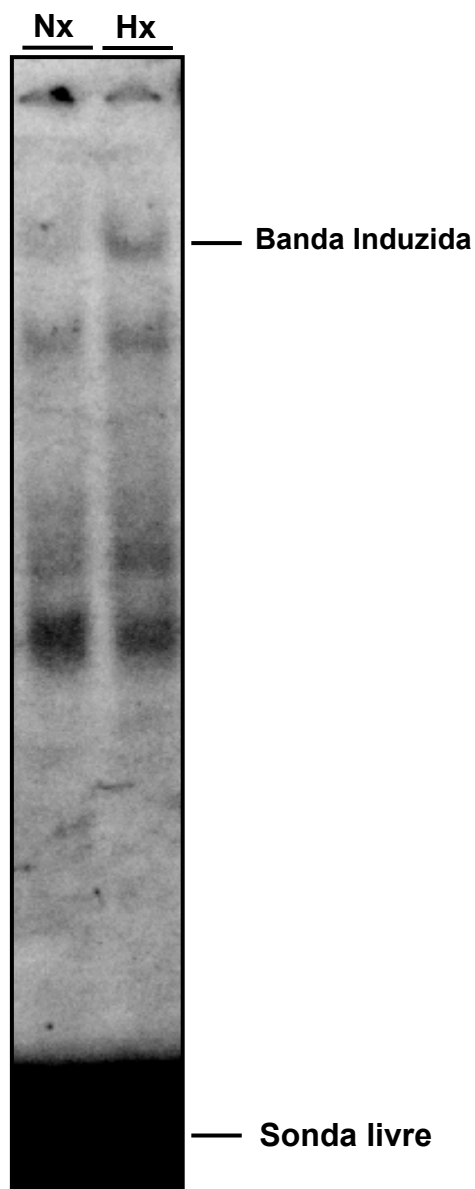


Figura 31. Teste de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA). Análise de atividade de ligação de proteínas endógenas de leveduras ao elemento responsivo à hipóxia (HRE) foi feita usando a sonda EPO marcada radioativamente em um gel de poliacrilamida nativo (5%). Cada reação continha 150.000 c.p.m. da sonda EPO, 0,3 μg de poli (dl-dC) e 50 μg de extrato total de levedura. As fontes dos extratos usados estão indicadas como: EG103 incubadas sob condições de normóxia (Nx, 20% O_2) ou hipóxia (Hx, 0,03% O_2). A proteína endógena induzida sob hipóxia que se liga ao sítio de reconhecimento está indicada. O experimento foi repetido duas vezes.

10. Clusters de HRE no genoma da levedura *S. cerevisiae*

Nós usamos o programa RSAT (Ferramenta de Análise de Seqüência Regulatória) para pesquisar elementos responsivos à hipóxia (HRE) em potencial nas seqüências regulatórias a montante de todos os genes de *S. cerevisiae*. Das 5.863 ORFs analisadas no banco de dados de leveduras, encontramos 807 promotores de genes contendo motivos HRE. O tamanho que escolhemos para todas as seqüências a montante foi de 800 pb, já que bons resultados nesse tipo de pesquisa são geralmente obtidos com regiões de -800 a -1 a partir do códon de iniciação da transcrição (Fonte: RSAT). Em leveduras, 99% de todos os elementos a montante conhecidos são encontrados dentro dessa região (fonte: TRANSFAC). Uma vez que o DNA genômico da levedura é dupla-fita, o programa RSAT pesquisou por sítios de ligação do HIF-1 em ambas as fitas, procurando na direção 5' → 3', e registrando os motivos encontrados. Nós analisamos os resultados e encontramos 91 promotores que contêm *clusters* de HRE (dois ou mais motivos). Posteriormente, as seqüências encontradas foram validadas estatisticamente.

11. Validação estatística dos resultados obtidos com o programa RSAT

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos após a análise usando o TRANSFAC e descreve 73 genes de *S. cerevisiae* que possuem HREs em potencial. Ela também mostra os valores de p e a localização destes elementos a partir do códon de iniciação da transcrição de cada gene. Das 91 seqüências analisadas, 18 tinham *clusters* de HRE em suas regiões regulatórias que não foram dadas como sendo estatisticamente significantes. A diferença observada nos tamanhos de todos os motivos na Tabela 9 é devido à definição da PWM no TRANSFAC.

Tabela 9. HRE em potencial nas regiões regulatórias a montante dos genes de levedura. Os motivos encontrados no genoma de *S. cerevisiae* foram analisados através do banco de dados TRANSFAC e a validação estatística foi feita como indicada pelo valor de p (p-value). * Seqüências são mostradas na direção 5' → 3', mas o HRE está na fita reversa complementar. O centro do motivo esta sublinhado e os genes em negrito se referem àqueles onde dois ou mais motivos foram validados estatisticamente. Motivos foram considerados estatisticamente significativos usando um valor de corte de p de 0,1. N.S: Não significativo.

Nome do gene	Seqüência (5' → 3')	Localização	Valor de p
ALD6	G <u>GCGACGTGCTGGT</u>	[-645:-632]	0.040
	T <u>ACGTGAGG</u>	[-707:-699]	0.081
ARO9	CTAGGC <u>ACGTGGCTGC</u>	[-588:-573]*	0.019
	GTACGC <u>ACGTGGGCGA</u>	[-472:-457]	0.084
	TTGCTC <u>ACGTGACCGA</u>	[-258:-243]	0.095
	TTCC <u>ACGTGCTCCG</u>	[-529:-514]	0.098
ASC1	GAGG <u>ACGTGCTTCT</u>	[-245:-232]*	0.019
	AAT <u>ACGTGGTTC</u>	[-483:-472]*	NS
ATM1	TAT <u>ACGTGCCCT</u>	[-187:-176]*	0.061
	AATTT <u>ACGTGATGTA</u>	[-166:-151]	0.035
BUD7	GTGTT <u>ACGTGACGCT</u>	[-254:-239]	0.025
	T <u>ACGTGGTTC</u>	[-524:-515]*	NS
CIS3	T <u>GCGTGCGT</u>	[-442:-434]*	0.059
	GAAAAC <u>ACGTGACCTG</u>	[-460:-445]	0.009
	AAATGC <u>ACGTGTCTGT</u>	[-574:-559]	NS
CTF19	TAAGCC <u>ACGTGGGCC</u>	[-298:-283]*	0.089
	AGC <u>ACGTGCATG</u>	[-331:-320]*	NS
CWP1	T <u>GCGTGCGG</u>	[-307:-299]*	0.006
	G <u>ACGTGGTTG</u>	[-701:-697]	NS
DAN1	CAATCCTC <u>ACGTGCTTTCTT</u>	[-514:-495]*	0.034
	C <u>GCGTGCCCT</u>	[-229:-220]*	NS
	AATAAC <u>ACGTGCCTTT</u>	[-59:-44]*	0.040
GIT1	G <u>GCGTGCTCG</u>	[-359:-350]	NS
	ACT <u>ACGTGCTGC</u>	[-479:-468]	0.080
	GCGC <u>ACGTGCATGA</u>	[-521:-508]*	0.036
	GCAG <u>ACGTGAGTTG</u>	[-55:-42]*	0.091
	AAA <u>ACGTGGGGC</u>	[-645:-634]	NS
GLY1	GA <u>ACGTGC</u>	[-204:-195]*	NS
	TGTGCAGC <u>ACGTGACCCACG</u>	[-504:-485]*	0.037
	G <u>GCGTGCCG</u>	[-636:-628]	NS
	GCG <u>GCGTGATAAG</u>	[-680:-667]*	NS
GPA2	<u>GCGTGCGTGACGCC</u>	[-157:-144]*	0.042
	G <u>GCGTGCTCC</u>	[-360:-351]*	NS
	C <u>GCGTGATTT</u>	[-28:-19]*	NS
GSH1	GTAGTC <u>ACGTGCGCGC</u>	[-372:-357]	0.0002
	CTTTCC <u>ACGTGGTCTC</u>	[-112:-97]*	0.043
	GAAT <u>ACGTGTGTGT</u>	[-601:-588]	NS
HIF1*	G <u>GCGTGAGG</u>	[-689:-681]	0.096
	CGTCTC <u>ACGTGTTTC</u>	[-666:-651]*	NS
	T <u>GCGTGACG</u>	[-509:-501]	NS
HMS2	GAGC <u>ACGTGCGACG</u>	[-399:-386]*	0.079
	TCTG <u>ACGTGCGGCT</u>	[-15:-2]	NS
HXK1	GCAC <u>ACGTGCGGGA</u>	[-466:-453]	0.003
	C <u>GCGTGGGTT</u>	[-563:-554]	NS
	GAGT <u>ACGTGTTTCT</u>	[-634:-621]*	NS
	CAACAGTC <u>ACGTGCGCATCT</u>	[-776:-757]*	0.015
ICY2	GGGGT <u>ACGTGTGTTT</u>	[-373:-358]	0.055
	AAGAGA <u>ACGTGCAACC</u>	[-467:-452]	NS
	TAGAAAGC <u>ACGTGACTTACG</u>	[-487:-468]*	0.009

	GTTATCACGTGATAGT	[-465:-450]	0.002
	TGAATCACGTGTGCCT	[-402:-387]*	NS
	CGTTTCGTGCGGG	[-507:-496]*	NS
IES5	TGTAAGTCACGTGAAATATT	[-205:-186]*	0.030
	ATGTGCACGTGATGTG	[-165:-150]*	0.060
	GCGGTGATGG	[-150:-141]*	NS
IES6	CGTGGGTCACGTGCTGCACA	[-480:-461]*	0.037
	GCGGTGCCG	[-337:-329]*	NS
	GCGGCGTGATAAG	[-298:-285]	NS
INM1	GCGGTGCGT	[-245:-237]*	0.094
	AATTACACGTGGTTTT	[-400:-385]	0.064
	AAAGCAACGTGCGCAA	[-149:-134]	NS
LST4	GTACACGTGCGTGT	[-245:-232]*	0.095
	TACGTGAGT	[-319:-310]*	NS
MBF1	GTGTTACACGTGACGCT	[-510:-495]*	0.025
	TACGTGGTTC	[-234:-225]*	NS
MET10	GTGGTCACGTGCTTCT	[-236:-221]	0.003
	AAGCTCACGTGGTGTG	[-254:-239]	0.045
MET28	TAAGTCACGTGCACTC	[-224:-209]	0.010
	GCGGTGAGTC	[-107:-98]*	NS
MET3	CTGGTCACGTGACCTT	[-382:-367]	0.013
	AAAGTCACGTGTAATT	[-365:-350]*	0.083
MET6	AATATTTACGTGACTTACA	[-502:-483]*	0.030
	ATGTGCACGTGATGTG	[-538:-523]	0.060
MNN1	TGCGTGCGC	[-376:-368]*	0.012
	CGTGCCACGTGCTTTT	[-361:-346]*	0.063
MNN5	GTGGTCACGTGATGTG	[-548:-533]	0.003
	GCGGTGCCG	[-709:-701]	NS
NCE103	CGTAAGTCACGTGCTTTCTA	[-344:-325]*	0.009
	GTTATCACGTGATAGT	[-362:-347]*	0.002
	TGAATCACGTGTGCCT	[-425:-410]	NS
	CGTTTCGTGCGGG	[-316:-305]	NS
NCP1	TGCGTGCGT	[-376:-368]	0.050
	GACACATCACGTGTGTGCTC	[-249:-230]*	0.026
	C CGTGATTT	[-547:-538]	NS
PIL1	TGCGTGAGG	[-291:-283]	0.025
	GACGTGGCTG	[-422:-413]	NS
RAD59	AAAAGCACGTGACGTG	[-203:-188]	0.030
	C GCGTGTTTC	[-585:-576]	NS
RCS1	C GCGTGCGG	[-636:-628]	0.045
	C GCGTGCTCG	[-390:-381] *	NS
RHR2	C GCGTGCGC	[-403:-395]*	0.087
	AAAGAAACGTGGTGGT	[-626:-611]	NS
	ATTAACGCGTGCGGG	[-466:-451]*	NS
RNR3	TGCGTGCGA	[-554:-546]	0.031
	TGCGTGCCG	[-365:-357]*	0.057
RPS4A	GAGCACGTGCGACG	[-742:-729]	0.079
	AGTACGTGGTCT	[-195:-184]*	NS
SBH2	GCGTGCGTGACGCC	[-485:-472]	0.042
	C GCGTGATTT	[-610:-601]*	NS
	G GCGTGCTCC	[-278:-269]	NS
SIS2	TGCGTGCGT	[-269:-261]	0.059
	TGATTCACGTGATCTA	[-489:-474]*	0.088
	G GGTACGTGTGTTA	[-410:-397]	NS
SNF11	GAAAGCACGTGAGCGT	[-642:-627]*	0.015
	TACGTGGGGT	[-129:-120] *	NS
	GAAGAAACGTGAAAAG	[-391:-376]	NS
SPA2	GCGCTGAGG	[-65:-57]*	0.096
	CGTCTCACGTGTTTC	[-95:-80]	NS
	TGCGTGACG	[-245:-237]*	NS

SPL2	CGCACGTGGGCG	[-149:-138]*	0.090
	CTAGGCACGTGGCTGC	[-36:-21]	0.019
	TTGCTCACGTGACCGA	[-366:-351]*	0.095
	TTTCCCACGTGCTCCG	[-95:-80]*	0.098
SRB2	TGCGTGCGT	[-311:-303]*	0.050
	GAGCACACACGTGATGTGTC	[-449:-430]*	0.026
	CGCGTGATTT	[-245:-237]*	NS
STB3	CCGCACGTGCGCGC	[-484:-471]*	0.023
	TGCGTGAGA	[-379:-371]	NS
	AAATTCACGTGCTCCG	[-190:-175]	0.018
	AATTTAACGTGCTTCT	[-265:-250]	NS
SUC2	ATAATAACGTGCAAAA	[-526:-511]*	NS
	TGGACGTGGGGT	[-406:-395]	0.032
SWE1	GCGGTGCCCTT	[-545:-536]*	NS
	GTGGTCACGTGATGTG	[-359:-344]*	0.003
TDH2	GCGGTGCCCC	[-191:-182]*	NS
	CGTACGTGCGGT	[-225:-214]	0.0003
	TTTACCACGTGATCTG	[-406:-391]*	0.032
TPS1	TTAAAAACGTGTTTGA	[-651:-636]*	NS
	GCTGACGTGCTTGG	[-383:-370]	0.070
	CGGGCGTGGTGC	[-578:-567]*	NS
USO1	TGACGTGCTTG	[-78:-69]*	NS
	AAAAGCACGTGACGTG	[-524:-509]*	0.030
VTC3	CGCGTGGTTC	[-136:-127]*	NS
	TAAGCCACGTGGGCC	[-350:-335]	0.089
YAP5	AGCACGTGCATG	[-313:-302]	NS
	TAAGTCACGTGCACTC	[-281:-266]*	0.010
YCR087C-A	GCGGTGAGTC	[-392:-383]	NS
	TATACGTGCGGT	[-575:-564]*	0.008
YHR033W	AAGGCCACGTGACGCA	[-443:-428]*	NS
	TGCGTGCCG	[-387:-379]	0.044
YIL055C	TAATACACGTGCCCCG	[-223:-208]*	0.034
	CGCGTGCGC	[-732:-724]	0.087
YLL056C	AAAGAAACGTGGTGGT	[-516:-501]*	NS
	ATTAACGCGTGCGGG	[-676:-661]*	NS
YLR049C	TACGTGAGG	[-535:-527]	0.081
	TGGACGTGAGCT	[-734:-723]	NS
YLR156W**	TATACGTGCAGC	[-81:-70]	0.021
	TGCGTGCGC	[-116:-108]	0.006
	CGCGTGATTT	[-62:-53]*	NS
YLR157W-D**	CGTACGTGATGG	[-777:-766]	0.039
	TACGTGATTC	[-185:-176]	NS
YLR159W**	CGTACGTGATGG	[-777:-766]	0.039
	TACGTGATTC	[-185:-176]	NS
YLR161W**	CGTACGTGATGG	[-777:-766]	0.039
	TACGTGATTC	[-185:-176]	NS
YSR3	CGTACGTGCTCG	[-188:-177]	0.020
	GTGGACGTGCCTAT	[-323:-310]*	NS
	AAAGTAACGTGGGGAC	[-228:-213]*	NS
ZRT3	AGATGGCGTGCTTCTAAT	[-243:-234]*	NS
	GTACACGTGCGTGT	[-575:-562]	0.095
	TACGTGAGT	[-496:-488]	NS

* Note que HIF1 se refere ao componente da histona acetiltransferase B de levedura, um complexo localizado principalmente no núcleo (Poveda et al., 2004) e não ao fator 1 humano induzível por hipóxia (HIF-1).

12. Classificação dos genes de leveduras que possuem HRE

Em um trabalho de revisão recentemente publicado por Wenger *et al.* (2005), cerca de 70 genes alvos regulados por hipóxia conhecidos foram descritos e os autores sugerem que pelo menos 200 genes podem ser regulados por baixos níveis de oxigênio em mamíferos. Os genes que estes autores descreveram participam de processos celulares tais como suprimento de oxigênio, metabolismo, crescimento celular e apoptose e outros que participam de uma ampla variedade de funções. Na Tabela 10 nós listamos, de acordo com os papéis em diferentes processos biológicos, o total de 24 genes da Tabela 9 que apresentaram dois ou mais motivos validados. Interessantemente verificamos a presença de um gene que participa da glicólise (TDH2, que codifica para a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e outro envolvido no ciclo do ácido cítrico (IDH1, que codifica para a isocitrato desidrogenase), como também alguns outros que participam do metabolismo de aminoácidos.

Tabela 10. Genes de levedura que contêm *clusters* de HRE em potencial listados de acordo com suas funções biológicas. O número de motivos estatisticamente significativos para um dado gene está indicado na última coluna. * Se refere aqueles genes que possuem seus níveis transcricionais aumentados sob condições de anaerobiose em *Saccharomyces cerevisiae* segundo estudos de ter Linde *et al.* (1999).

Gene de levedura	Nome do gene/descrição	Processo Biológico	Motivos HRE
TDH2*	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Metabolismo de carboidrato	2
ARO9	Aminotransferase II de aminoácido aromático	Metabolismo de aminoácidos	4
MET3	ATP sulfurilase	Metabolismo de aminoácidos	2
MET6*	5-metil-tetra-hidropteroil triglutamato homocisteína metiltransferase	Metabolismo de aminoácidos	2
MET10	Subunidade α da sulfito redutase	Metabolismo de aminoácidos	2
IES5	Subunidade 80 da Ino	Remodelamento da cromatina	2
NCE103	Proteína semelhante à anidrase carbônica	Resposta ao estresse oxidativo	2
RNR3	Ribonucleotideo redutase, subunidade menor (R1)	Replicação do DNA	2
SRB2	RNA polimerase II holoenzima/subunidade mediadora	Manutenção do telômero, regulação da transcrição	2
CIS3*	Clk1 Suppressing	Estrutura da parede celular	2
MNN1*	Alfa-1,3-manosiltransferase	Estrutura da parede celular	2
GIT1	Permease envolvida na captação de glicerolfosfoinositol (GroPIs)	Transporte de glicerolfosfodiester	3
SIS2	Slf4 Supressor	Transição do ciclo celular mitótico, biosíntese coenzima A, regulação da progressão através do ciclo mitótico celular, resposta o estresse salino	2
ALD6	Aldeído desidrogenase	Biosíntese de acetato	2
ATM1*	Transportador ABC	Homeostase de íons de ferro	2
GSH1	Gama-glutamilcisteína sintetase	Biosíntese de glutatona	2
IDH1	Isocitrato desidrogenase 1 subunidade alfa-4-beta-4	Biosíntese de glutamato, metabolismo do isocitrato, ciclo do ácido cítrico	2
INM1	Inositol monofosfatase	Defosforilação do fosfatidilinositol	2
NCP1*	NADP-citocromo P450 redutase	Transporte de eletróns, biosíntese de ergosterol	2
SPL2	Supressor da deleção de PLC1	Enzima com atividade inibitória	4
STB3	Proteína ligante 3 Sin	Desconhecida	2
ICY2	ORF, Não caracterizada	Interage com o citoesqueleto	2
YHR033W	ORF, Não caracterizada	Desconhecida	2
YLR049C*	ORF, Não caracterizada	Desconhecida	2

13. Motivos LORE no genoma da levedura *S. cerevisiae*

Similarmente ao HRE, nós procuramos por motivos LORE no genoma da levedura *S. cerevisiae* usando como seqüência padrão 5'-ACTCAACAA-3' e verificamos a existência de somente 26 genes que possuem esse motivo (Tabela 11). Dentre os 642 genes descritos por ter Linde *et al.* (1999) induzidos sob condições de anaerobiose, apenas quatro apresentaram o motivo LORE (em negrito na Tabela 11).

Tabela 11. Relação dos genes de levedura que possuem motivos LORE em potencial. Os genes em negrito se referem àqueles que são induzidos sob condições anaeróbicas com os níveis de indução indicados entre parênteses.

Nome do Gene
ARK1, ASG1, BSC2, BUL2 (1,5X) , DNF1, FKH1, GAT2 (1,5X) , GID8, HAP1, MTG2, MTD1, NDL1, NEO1, OLE1 (3x) , PEX31, RPL35A, SDS23, SFT1, SRP72, TRZ1, VPS35, YAL064C-A, YAL010C, YAL009W, YFL052W (2X) , YHR212W-A

VII. Discussão

1. *S. cerevisiae* como um modelo de estudo

Células expostas a condições limitantes de O₂, normalmente ajustam seus níveis de expressão gênica. Essas mudanças permitem que as células se adaptem e sobrevivam sob condições de déficit de O₂ e energia. Quando mecanismos protetores estão ausentes, o dano à célula e subsequente morte celular podem ocorrer. Muitos estudos têm demonstrado a participação do HIF-1 em processos fisiológicos, na progressão de tumores e outros processos patológicos, através do controle transcricional de grupos de genes tais como aqueles que codificam para fatores angiogênicos, transportadores de glicose, enzimas glicolíticas e fatores de sobrevivência celular. Numerosos estudos têm sido conduzidos na tentativa de entender melhor os mecanismos que modulam a função do HIF-1, tais como as modificações pós-traducionais e quais são os parceiros que interagem com esse fator de transcrição.

As modificações pós-traducionais da subunidade HIF-1 α são importantes para a atividade dessa proteína e regulação posterior de genes alvos controlados pelos níveis de O₂. Nesse estudo, desenvolvemos um sistema de levedura para a expressão das subunidades do HIF-1 humano sob controle de um promotor constitutivo. Ambas subunidades do HIF-1 foram expressas sob condições normais de oxigênio, sem indicação de produtos de degradação. As análises de ensaios de EMSA mostraram que as proteínas expressas heterologicamente foram capazes de se ligar à seqüência do *enhancer* 3' do gene da eritropoietina humana que contém o motivo HRE. Para verificar se os resultados obtidos nos experimentos de EMSA foram indicativos da interação entre HIF-1 α e ARNT, nós produzimos uma linhagem duplo-transformada que expressa o HIF-1 α tipo selvagem e uma versão truncada do ARNT (EG103 $\alpha\beta$). O ARNT truncado não possui os primeiros 139 aminoácidos da extremidade NH₂-terminal e como mostrado para uma construção similar (Gradin *et al.*, 1996), é incapaz de se dimerizar ao DNA. Como esperado, a abolição da ligação ao DNA foi observada quando foi usado o extrato de células EG103 $\alpha\beta$.

Tem sido frequentemente demonstrado que a fosforilação pode mudar o padrão de migração de uma proteína em géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Richard *et al.* (1999) mostraram que o HIF-1 α endógeno de células HeLa incubadas sob condições de hipóxia migra com padrão muito difuso (104–116 kDa) quando analisado por SDS-PAGE. HIF-1 α traduzido *in vitro* ou HIF-1 α extraído de células HeLa submetidas à hipóxia e cujo extrato protéico foi previamente defosforiladas com uma λ fosfatase, mostra um decréscimo notável em sua massa molecular de 116 kDa para 104 kDa. A diminuição na massa molecular do HIF-1 α traduzido *in vitro* provavelmente ocorre porque esta é uma condição onde poucas modificações pós-traducionais são possíveis, indicando que o HIF-1 α sofre fortes modificações pós-traducionais quando expresso em um sistema celular completo. A fosforilação do HIF-1 α pode ser devido à atividade da MAP quinase p42/44 e da quinase p38 (Gao *et al.*, 2002).

Embora ambas MAPK fosforilem o HIF-1 α *in vitro*, estudos com mutações nos sítios de fosforilação do HIF-1 α sugerem que sua transativação não é afetada ou mediada diretamente pela fosforilação. É possível que MAPKs exerçam seus efeitos em cofatores do HIF-1 (Huang e Bunn, 2003). No entanto, usando HIF-1 α recombinante expresso em bactérias como substrato em experimentos de fosforilação (nesse ensaio o HIF-1 α recombinante purificado não fosforilado foi incubado com extratos de células HeLa), Mylonis *et al.* (2006) mostraram que a MAPK p42 de extrato de células HeLa modifica dois resíduos de serina nas posições 641 e 643, dentro do domínio inibitório (ID) do HIF-1 α . Após mutações desses sítios eles verificaram que a atividade transcricional do HIF-1 α não foi afetada quando testada em um sistema de levedura, como descrito anteriormente (Braliou *et al.*, 2006), mas inibiu fortemente ambas atividade e acúmulo dessa proteína no núcleo de células HeLa. Portanto, o papel da fosforilação do HIF-1 α ainda permanece controverso.

Células de leveduras são capazes de fazer várias modificações pós-traducionais como os eucariotos multicelulares. *S. cerevisiae* possui cinco classes principais de MAPKs: Fus3, Kss1, Slt2/Mpk1, que pertencem à família de MAPKs do tipo ERK, Hog1 homóloga à p38 MAPK e finalmente, a MAPK Smk1 (Gustin *et al.*, 1998, Posas *et al.*, 1998) que media diferentes processos fisiológicos. O presente trabalho, sugere que o HIF-1 α humano poderia ser fosforilado por uma das MAPK de leveduras. De fato nós observamos que o padrão de migração do HIF-1 α humano

recombinante produzido na levedura foi igual ao encontrado em extratos nucleares de células HeLa incubadas sob hipóxia (aproximadamente 116 kDa), o qual é fosforilado. Nós não observamos nenhum sinal na região de 104 kDa (correspondente à forma defosforilada do HIF-1 α) nos experimentos de western blot, indicando que todo o HIF-1 α expresso em levedura pode ter sido fosforilado.

Enquanto este trabalho estava sendo desenvolvido, um trabalho similar no que diz respeito à expressão das subunidades do HIF-1 em leveduras foi publicado (Braliou *et al.*, 2006). Esses autores co-expressaram ambas subunidades do HIF-1 (α e β) na levedura *S. cerevisiae*. Usando um plasmídeo contendo um gene repórter sob controle de elementos HRE, os autores mostraram que o HIF-1 α e ARNT co-expressos em levedura montam um fator de transcrição heterodimérico funcional. Esses autores também verificaram a importância da Hsp90 de leveduras na atividade ótima do HIF-1 expresso nessas células. Usando inibidores específicos de Hsp90 (geldanamicina e radicicol), os quais já foram demonstrados ter um efeito inibitório na atividade transcricional do HIF-1 em células de mamíferos, eles inibiram significativamente a atividade do HIF-1 em leveduras. Portanto, esses resultados demonstraram que o sistema de levedura contém os componentes mínimos necessários para uma resposta transcricional à hipóxia similar àquela presente em humanos. Com esses resultados, as evidências apresentadas dão suporte à hipótese de que os aspectos críticos do mecanismo de “sentir” o oxigênio são altamente conservados entre todos os eucariotos e provavelmente uma via de resposta semelhante ao HIF-1 esteja presente em leveduras. Nossos resultados adicionam a esses dados por mostrar que o HIF-1 α expresso em leveduras é provavelmente fosforilado, um mecanismo básico necessário para a ativação e regulação do HIF-1 α (Richard *et al.*, 1999). Assim postulamos que, como o HIF-1 foi capaz de ativar a transcrição do gene repórter da β -galactosidase em leveduras (Braliou *et al.*, 2006) esse microorganismo talvez possua co-ativadores capazes de reconhecer o HIF-1 e levar à sua ativação. Além disso, temos indício de que o HIF-1 altera o padrão de crescimento das células transformadas.

A atividade de prolil 4-hidroxilase é necessária para levar o HIF-1 α à degradação. Em relação à presença de prolil 4-hidroxilases em leveduras, até o momento, não existe descrição de proteínas específicas de *S. cerevisiae* que participam da degradação mediada pelo proteasoma através de um complexo de ubiquitinação contendo o VHL. Além disso, a atividade de prolil 4-hidroxilase é

geralmente considerada ausente em microorganismos. O único modelo onde sua atividade foi descrita foi em *Hansenula polymorpha*, um sistema de expressão bem conhecido, que inesperadamente apresentou a capacidade endógena de hidroxilar resíduos de prolina (de Bruin *et al.*, 2001). Apesar de não ter sido descrito qualquer homólogo ao VHL ou HIF prolin 4-hidroxilase em levedura, estão presentes uma via de degradação dependente de ubiquitinação e uma via proteasoma 20S. Em leveduras, existem 14 genes que codificam para as subunidades do proteasoma 20S e o proteasoma forma uma população uniforme na qual cada partícula tem as mesmas 14 subunidades diferentes (Chen e Hochstrasser, 1995). Baseados nessa informação, no início desse trabalho nós especulamos se o HIF-1 α poderia ser expresso estavelmente em leveduras sem ser alvo de degradação sob condições de normóxia. Como pudemos verificar o HIF-1 α expresso em leveduras não foi degradado sob condições de normóxia. Verificamos também que HIF-1 α expresso em ambas condições de normóxia (20% O₂) e hipóxia (1,3% e 0,03% O₂) apresentou o mesmo padrão de migração.

2. Presença de HRE em potencial no genoma de *S. cerevisiae*

Desde a descrição da seqüência completa do genoma da levedura *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996) um grande número de informações têm sido obtido sobre as respostas moleculares desta levedura a diferentes condições experimentais. A análise funcional de sítios de ligação de fatores de transcrição através de trabalhos experimentais (EMSA) é a melhor maneira de demonstrar a interação e funcionalidade de um complexo DNA-proteína, mas não é a única maneira de obter informações sobre esses sítios. Após a disponibilidade do banco de dados do genoma da levedura, o desenvolvimento de novos métodos computacionais tem sido encorajado para a análise dos dados disponíveis e melhor entendimento da maquinaria regulatória. Algoritmos e ferramentas de bioinformática para procurar por elementos regulatórios podem ser divididos em duas classes mais importantes: 1) métodos que procuram por motivos de ligação de fatores de transcrição conhecidos (por exemplo, o uso de PSSMs, como MatInspector; Quandt *et al.*, 1995; Elkon *et al.*, 2003; e Aerts *et al.*, 2003); 2) métodos que tentam detectar novos padrões consenso dentro de um conjunto de

seqüências de DNA. MEME (Bailey e Elkan, 1995) emprega uma técnica de EM para construir um consenso comum de um dado grupo de seqüências de DNA, enquanto Thijs *et al.* (2002) e Hughes *et al.* (2000) usam uma técnica de amostragem Gibbs para detectar padrões comuns. Neste trabalho nós utilizamos ferramentas de bioinformática para procurar motivos similares ao elemento de resposta à hipóxia nas seqüências a montante de todos os genes disponíveis de levedura.

A coleção de dados sobre os fatores de transcrição de leveduras e seus respectivos genes alvos e sítios de ligação no CYGD (Comprehensive Yeast Genome Database), é estruturalmente baseada no banco de dados do TRANSFAC[®] (Güldener *et al.*, 2005). Essa coleção de dados não contém somente informações relevantes sobre fatores de transcrição (Matys *et al.*, 2003) como também uma tabela com a *Position Weight Matrices* (PWM), uma representação comum dos sítios de ligação dos fatores de transcrição derivados da coleção de sítios de ligação. Assim o TRANSFAC[®] procura por motivos em uma seqüência promotora submetida com uma PWM fornecida [para mais detalhes sobre PWM e cálculo de valor de p veja Hertzberg (2003) e Hertzberg *et al.*, (2005)].

Apesar da importância crucial na regulação de gene hipóxicos, um simples centro de ligação dentro do HRE é considerado insuficiente para levar à transcrição desses genes. De fato, a ligação de fatores adicionais ao HRE parece necessária para uma indução ótima sob hipóxia (Elbert e Bunn, 1998). Já que fatores de transcrição usualmente se ligam a regiões promotoras contendo grupos de um determinado motivo (Bailey e Noble, 2003), nós consideramos somente seqüências contendo dois ou mais motivos. No entanto, não sugerimos que um único motivo em uma seqüência regulatória não seja funcional. De fato, alguns genes conhecidos que respondem a estímulos hipóxicos contêm um único HRE funcional em suas regiões regulatórias, tais como VEGF humano e de rato (Liu *et al.*, 1995, Levy *et al.*, 1995), GLUT-1 de murino (Ebert *et al.*, 1995), PFK L (Semenza *et al.*, 1994), como também alguns outros (revisado por Wenger e Gassmann, 1997).

Neste estudo, o gene *TDH2* que codifica para a enzima glicolítica de levedura gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase 2 foi mostrado ter dois motivos HRE estatisticamente significantes (Tabela 9 e 10). A levedura possui três genes que codificam para esta enzima, chamados de GAPDH1, GAPDH2 e GAPDH3 (Holland *et al.*, 1981; Holland *et al.*, 1983). O promotor do gene GAPDH humano tem um HRE

consistindo de dois sítios do consenso do HIF-1 arranjados em repetições invertidas e separados por cinco pares de base e um outro HRE situado mais perto ao sítio de iniciação da transcrição (Graven *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2002). A expressão de GAPDH de mamífero é regulada de uma maneira específica dependendo do tipo celular por vários fatores, incluindo hipóxia (Graven *et al.*, 1994, Lu *et al.*, 2002). Além disso, GAPDH de mamíferos possui funções diversas que aparentemente são independentes de seu papel na glicólise, tal como reparo ao DNA (Sirover, 1999; Meyer-Siegler *et al.*, 1991). Devido à importância do HIF-1 na regulação de enzimas glicolíticas e as diversas funções da GAPDH de mamíferos, acreditamos que esses HREs em TDH2 estimulem futuros estudos para entender o papel dessa enzima na resposta à hipóxia em leveduras.

Dos 642 genes descritos por ter Linde *et al.* (1999) que tiveram seus níveis de expressão aumentados sob condições anaeróbicas, alguns deles foram demonstrados conter HRE em potencial e estão listados na Tabela 9. Esses genes são: *DAN1*, *HMS2*, *YSR3* (níveis transcricionais aumentados mais que três vezes), *MNN1*, *NCP1*, *RHR2* (níveis transcricionais aumentados mais que duas vezes), *ATM1*, *CIS3*, *MET6*, *SUC2*, *TDH2*, e *YLR049C* (níveis transcricionais aumentados mais que uma vez e meia) (ter Linde *et al.*, 1999; *Saccharomyces Genome database* – SGD web site). Entre esses genes, *MNN1*, *NCP1*, *ATM1*, *CIS3*, *MET6*, *TDH2*, e *YLR049C* tiveram *clusters* validados de motivo HRE (indicados com um asterisco na Tabela 2).

O elemento LORE foi identificado dentro da região promotora do gene *OLE1*, um gene regulado quando as células são submetidas a condições anaeróbicas ou tratadas com metais de transição ou quelantes de ferro (Vasconcelles *et al.*, 2001). Jiang *et al.* (2001) mostraram que Mga2p é um componente do complexo de ligação do LORE usando ensaios de EMSA. Pelo fato de que não se sabe se Mga2p é um ativador transcricional clássico, esses autores sugerem que Mga2p pode se ligar ao LORE tanto diretamente quanto indiretamente através de uma interação com outras proteínas. Alternativamente, Mga2p pode se ligar a um outro fator de ligação do LORE ainda desconhecido e formar o complexo de ligação de LORE que é normalmente observado (Jiang *et al.*, 2001).

No presente trabalho, nós procuramos por elementos LORE em potencial de uma maneira similar ao que foi feito para HRE no genoma de levedura (regiões regulatórias a montante) e encontramos 26 genes positivos, todos eles com um

único motivo LORE (Tabela 11). Nós verificamos que somente quatro deles são regulados anaerobicamente: *OLE1* ($\Delta 9$ ácido graxo desaturase), YFL052W (uma proteína com *cluster* de zinco que contém um domínio de ligação ao DNA), BUL2 (um componente do complexo Rsp5p E3-ubiquitina ligase) e GAT2 (uma proteína contendo motivos de dedos de zinco da família GATA). Os três últimos ainda não foram descritos na literatura por possuir o motivo LORE e essa é a primeira vez que eles são citados. No entanto, alguns dos resultados obtidos no presente trabalho diferem daqueles obtidos por Vasconcelles *et al.* (2001). Esses autores descreveram a presença de potentes motivos LORE nos promotores dos genes *OLE1*, *TRX2*, *FKH1*, *FTR1*, *RPL35A*, *MET22*, *ATF1*, *TIR1* e *SUT1*. Essa diferença pode ser explicada pelo fato que em nosso estudo nós usamos a seqüência consenso 5'-ACTCAACAA-3' para procurar por possíveis genes contendo o motivo LORE em suas seqüências regulatórias. Entretanto, esses autores mostraram motivos com alguns nucleotídeos divergentes dentro dos motivos (5'-ACCCAACAA-3', nos genes *ATF1* e *TIR1*; 5'-TTTCAACAA-3', no gene *SUT1* e 5'-ICTCAACAA-3' no gene *FTR1*, os nucleotídeos divergentes estão sublinhados).

De acordo com ter Linde *et al.* (1999), cerca de 642 genes de leveduras são induzidos sob condições anaeróbicas e nossos resultados mostram a presença do motivo LORE em apenas quatro deles (*YFL052W*, *GAT2*, *OLE1* e *BUL2*). Enquanto de acordo com Vasconcelles *et al.* (2001) somente os genes *OLE1*, *ATF1*, *TRX2* e *SUT1*, os quais contêm o motivo LORE, têm os níveis de mRNA aumentados sob condições de hipóxia. Similarmente aos resultados desse grupo, nossas análises também encontraram motivos LORE nos promotores dos genes *TRX2*, *FKH1*, *OLE1* e *RPL35A*. Esses resultados indicam que em adição ao LORE outros elementos responsivos ao oxigênio ainda desconhecidos possam existir em leveduras.

Em conclusão, nós mostramos que os genes humanos das subunidades do HIF-1 podem ser estavelmente expressos em células de leveduras. As proteínas são eficientemente expressas e a subunidade HIF-1 α parece ser fosforilada. Futuros estudos são necessários para entender o papel das modificações pós-traducionais do HIF-1 α e a importância da interação de seus coativadores, mecanismos necessários para a regulação transcricional do HIF-1. O uso da levedura como sistema para a expressão de proteínas heterólogas, junto a sua genética bem conhecida, torna esse modelo uma ferramenta útil para estudar a biologia molecular de fatores de transcrição. Estudos com o HIF-1 expresso em leveduras pode levar a

futuro entendimento da composição, função e importância das proteínas envolvidas nas modificações pos-traducionais do HIF-1 α . Além disso, nossos resultados validam esse sistema de expressão, o qual também poderá ser usado para medir os efeitos de agentes químicos, mutações endógenas e expressão de proteínas exógenas que afetam a atividade do HIF-1.

Neste trabalho, nós também descrevemos genes de leveduras que possuem HREs em potencial em suas seqüências promotoras. Baseado nesses resultados nós hipotizamos que uma proteína funcionalmente homóloga ao HIF-1 pode reconhecer os HREs em potencial encontrados nos genes de *S. cerevisiae* e induzir sua transcrição quando células de leveduras são sujeitas a baixos níveis de oxigênio. Apesar do fato de que os níveis de oxigênio que iniciam a resposta celular são diferentes entre leveduras e mamíferos, muitos estudos estão sendo feitos para tentar entender como essas vias em ambos os organismos “sentem” as tensões de oxigênio e como esse sinal é transduzido para ativar os fatores de transcrição. *S. cerevisiae* tem sido bastante estudada como modelo para entender melhor o papel do oxigênio na resposta transcricional de genes hipóxicos, já que é um organismo capaz de se adaptar a baixos níveis de oxigênio através da fermentação. A conservação evolucionária da resposta aos níveis de oxigênio de leveduras a eucariotos multicelulares significa que leveduras podem servir como um modelo adequado para a caracterização da resposta ao estresse em organismos mais complexos.

VIII. Conclusões Gerais

Quando tumores estão crescendo, gera-se um ambiente hipóxico em seu interior porque a angiogênese não é proporcional à proliferação celular. Nesta condição, o fator de transcrição HIF-1 é ativado. Sabe-se que quando se deleta o gene de HIF-1, tumores crescem mais, embora a vascularização seja menor. HIF-1 induz a apoptose e então, na sua ausência, as células que proliferam rapidamente são selecionadas como acontece em células deficientes em p53. A indução, dependente de HIF-1, de p53, de p21 e da supressão de Bcl-2 durante a parada do crescimento/apoptose em condição de hipóxia talvez reflita um intercâmbio entre estas vias. HIF-1 α é então muito importante na carcinogênese. Além disso, HIF-1 ativa a transcrição de genes necessários à sobrevivência celular sob condições de hipóxia em tecidos normais. Esse papel do HIF-1 na carcinogênese foi um aspecto importante que nos atraiu para estudos com esse fator de transcrição.

HIF-1 tem se sobressaído como um novo alvo para a terapia de câncer. Os alvos transcripcionais do HIF-1 são críticos para a biologia de tumores e angiogênese. O conhecimento sobre a importância do HIF-1 em condições fisiológicas e patológicas é bastante recente. HIF-1 α foi descoberto em 1995 (Wang e Semenza, 1993) e o primeiro estudo mostrando que a ausência do HIF-1 α retarda o crescimento tumoral data de 1997 (Jiang *et al.*, 1997), contrariamente ao seu papel anterior de induzir apoptose em tumores. Isso significa que em menos de uma década um grande e novo campo de investigação com impacto significativo na área de terapia tem se tornado um dos maiores alvos de pesquisa. Além disso, a conexão entre genes supressores de tumores/oncogenes, fatores de crescimento e cascata de fosforilação e a via do HIF-1 tem ajudado a entender melhor o envolvimento do HIF-1 em tumorigênese. Mas apesar das evidências tais como superexpressão do HIF-1 na maioria dos cânceres e metástases (Zhong *et al.*, 1999), níveis de expressão progressivos correlacionados com o aumento da malignância do tumor (Bos *et al.*, 2001), algumas dúvidas ainda permanecem sobre a contribuição do HIF-1 com o desenvolvimento do tumor.

Contrariamente, o HIF-1- α é um marcador de prognóstico em alguns tumores (Volm e Koomagi, 2000) e a perda da função do VHL causando a desregulação do HIF-1 não promove o crescimento tumoral (Mack *et al.*, 2003). Esses fatos refletem a

natureza multifatorial do câncer e o fato de que, em células derivadas de diferentes tecidos e expostas a diferentes condições experimentais (ex: quantidades/tipos de fatores de crescimento), a modulação da resposta hipóxica e a expressão relativa de genes regulados por hipóxia podem ser diferentes e, portanto, resultam em progressões diferentes de tumores.

Em resumo, a via do HIF-1 tem atraído muita atenção nos últimos anos devido às suas implicações em tumorigênese e muitos desses esforços têm levado à descobertas de promissores alvos terapêuticos. Muitos estudos são ainda necessários para estabelecer se o papel do HIF-1 α na proliferação celular e apoptose depende do genótipo, estado redox ou condições experimentais tais como pH, densidade celular, concentrações de oxigênio ou glicose, ou a quantidade de soro ou fatores de crescimento que são adicionados ao meio de cultura.

Muitos processos moleculares de resposta a condições de estresse são conservados entre mamíferos e leveduras como também a maquinaria basal da regulação transcricional. Partindo dessa premissa, e dos resultados observados em nossos estudos (expressão das subunidades do HIF-1 em condições de normóxia e atividade de ligação do heterodímero HIF-1 α /ARNT ao DNA) propomos então que leveduras servem como um poderoso modelo para os estudos da sinalização do HIF-1, sendo atrativas para o estudo do estresse oxidativo, a função e propriedades do HIF-1 e de suas subunidades. Esse potencial de *S. cerevisiae* se deve, não somente ao seu rápido crescimento e simplicidade genética em relação aos eucariotos superiores, mas também ao fato de que sua composição celular e funções poderem ser rapidamente manipuladas pela alteração das condições ambientais.

IX. Perspectivas

Como perspectivas futuras para melhor entender os papéis do estresse oxidativo e das modificações pós-traducionais, em específico a fosforilação do HIF-1 α , na funcionalidade desse fator de transcrição, pretendemos utilizar cepas selvagens e mutantes nos genes que codificam para as enzimas superóxido dismutase (CuZnSOD e MnSOD). Essas células estão em constantes condições de estresse quando cultivadas na presença de oxigênio e para melhor entendermos a influência desses mecanismos na estabilidade e atividade do HIF-1 pretendemos:

- Obter as linhagens EG110, EG118 e EG133 que expressem as duas subunidades do HIF-1, como também obter transformantes, incluindo EG103 $\alpha\beta$ e EG103 $\alpha\tau\beta$, que tenham a construção gênica descrita por Braliou *et al.* (2006).
- Juntamente com as linhagens recombinantes já obtidas, submetê-las a diversas condições de crescimento e tratamento:
 - ❖ Normóxia
 - ❖ Hipóxia
 - ❖ CoCl₂ (condição de tratamento que mimetiza hipóxia)
 - ❖ H₂O₂ (induz estresse oxidativo)
 - ❖ Ditiotreitól (condição de tratamento que mantém um ambiente reduzido)
 - ❖ Tratamento das culturas com inibidores de fosforilação (ex.: PD98059, bloqueia a MEK)
- Verificar a formação do heterodímero HIF-1 α /ARNT
- Verificar por EMSA e ensaio com gene repórter construído por Braliou *et al.* (2006) se as condições redox e a fosforilação em leveduras influenciam a atividade ligante do HIF-1 ao DNA.

Como foi verificado por Braliou *et al.* (2006) o HIF-1 expresso em leveduras foi capaz de formar um complexo ativo e induzir a expressão de um gene reporter. Sabe-se que proteínas auxiliares, chamadas de coativadores são importantes para a transativação do HIF-1. Nós então especulamos quais seriam essas proteínas endógenas de leveduras que poderiam estar interagindo com o HIF-1. Para isso, pretendemos também:

- Fazer um *screening* para tentar identificar as proteínas endógenas de leveduras que interagem com o HIF-1 e que possivelmente cooperam para a sua transativação, entre elas a Hsp90 de leveduras. Isso será feito por co-immunoprecipitação.

X. Bibliografia

- Aerts, S., Thijs, G., Coessens, B., Staes, M., Moreau, Y., and Moor, B.D. (2003). Toucan: Deciphering the cis-regulatory logic of coregulated genes. *Nucl. Acids. Res.* **31**: 1753–1764.
- Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G. and Lee, C.C. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell.* **91**: 1055-1064.
- Alfranca, A., Gutierrez, M.D., Vara, A., Aragonés, J., Vidal, F. and Landazuri, M.O. (2002). c-Jun and hypoxia-inducible factor 1 functionally cooperate in hypoxia-induced gene transcription. *Mol. Cell Biol.* **22**: 12–22.
- Alimardani, P., Régnacq, M., Moreau-Vauzelle, C., Ferreira, T., Rossignol, T., Blondin, B. and Berergès, T. (2004). SUT1-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose synergistic action is sufficient for this process. *Biochem. J.* **381**: 195–202.
- Amillet, J.-M., Buisson, N. and Labbe-Bois, R. (1996). Characterization of an upstream activation sequence and two Rox-1p-responsive sites controlling the induction of the yeast HEM13 gene by oxygen and heme deficiency. *J. Biol. Chem.* **271**: 24425-24432.
- Baby, S.M., Roy, A., Mokashi, A.M., Lahiri, S. (2003). Effects of hypoxia and intracellular iron chelation on hypoxia-inducible factor-1 α and -1 β in the rat carotid body and glomus cells. *Histochem Cell Biol.* **120**: 343-52.
- Bailey, T. and Elkan, C. (1995). Unsupervised learning of multiple motifs in biopolymers using expectation maximization. *Machine Learning.* **21**: 51–80.
-

-
- Bailey, T.L. and Noble, W.S. (2003). Searching for statistically significant regulatory modules. *Bioinformatics*. **Suppl 2**: II16-II25.
- Bandyopadhyay, R.S., Phelan, M. and Faller, D.V. (1995). Hypoxia induces AP-1-regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types. *Biochem. Biophys. Acta*. **1264**: 72-78.
- Bell, E.L., Emerling, B.M. and Navdeep S. Chandel, N.S. (2005). Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Mitochondrion* **5**: 322–332
- Berra, E., Richard, D.E., Gothie, E. and Pouyssegur, J. (2001). HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Lett*. **491**: 85-90.
- Blancher, C., Moore, J.W., Talks, K.L., Houlbrook, S., Harris, A.L. (2000). Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. **60**: 7106-7113.
- Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C.F., Mommers, E.C., Semenza, G.L., Pinedo, H.M., Abeloff, M.D., Simons, J.W., van Diest, P.J. and van der Wall, E. (2001). Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Ins*. **93**: 309–314.
- Bracken, C.P., Whitelaw, M.L. and Peet, D.J. (2003). The hypoxia-inducible factors: Key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell. Mol. Life. Sci*. **60**:1376-1393.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **72**: 248-254.
- Braliou, G.G., Venieris, E., Kalousi, A. and Simos, G. (2006). Reconstitution of human hypoxia inducible factor HIF-1 in yeast: A simple in vivo system to identify
-

-
- and characterize HIF-1 α effectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**: 1289–1296.
- Bruick, R.K. (2000). Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 9082-9087.
- Bruick, R.K. and McKnight, S.L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. **294**: 1337-1340.
- Brüne, B and Zhou, J. (2003). The role of nitric oxide (NO) is stability regulation of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α). *Current Medi. Chem.* **10**: 845-855.
- Burke, P.V., Raitt, D.C., Allen, L.A., Kellogg, E.A. and Poyton, R.O. (1997). Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast. *J. Biol. Chem.* **272**: 14705–14712.
- Cai, H. and Harrison, D.G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* **87**: 840–844.
- Camenisch, G., Tini, M., Chilov, D., Kvietikova, I., Srinivas, V., Caro, J., Spielmann, P., Wenger, R. H. and Gassmann, M. (1999). General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 α . *FASEB J.* **13**: 81-88.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J-M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D. and Keshet, E. (1998). Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature*. **394**: 485-490.
- Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H. and Poellinger, L. (2000). Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol. Cell Biol.* **20**: 402-415.
-

-
- Chachami, G., Paraskeva, E., Georgatsou, E., Bonanou, S. and Simos, G. (2005). Bacterially produced human HIF-1 α is competent for heterodimerization and specific DNA-binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**: 464–470.
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J. Biol. Chem.* **275**: 25130–25138.
- Chavez, J.C., Baranova, O., Lin, J. and Pichiule, P. (2006). The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J. Neurosci.* **26**: 9471-81.
- Chen, P. and Hochstrasser, M. (1995). Biogenesis, structure and function of the yeast 20S. Proteasome. *EMBO J.* **14**: 2620-2630.
- Chilov, D., Camenisch, G., Kvietikova, I., Ziegler, U., Gassmann, M. and Wenger, R.H., (1999). Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 α . *J. Cell Sci.* **112**: 1203-1212.
- Chun, Y.S., Choi, E.J., Kim, T.Y., Kim, M.S. and Park, J.W. (2002). A dominant-negative isoform lacking exon 11 and 12 of the human hypoxic-inducible factor-1 α gene. *Biochem. J.* **362**: 71-79.
- Chun, Y.S., Choi, E.J., Yeo, E.J., Lee, J.H., Kim, M.S., Park, J.W. (2001). A new HIF-1 alpha variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses. *J. Cell Sci.* **114**: 4051-4061.
- Chun, Y.S., Lee, K.H., Choi, E.J., Bae, S.Y., Yeo, E.J., Huang, L.E., Kim, M.S. and Park, J.W. (2003). Phorbol ester stimulates the nonhypoxic induction of a novel hypoxia-inducible factor 1 α isoform: implications for tumor promotion. *Cancer Res.* **63**: 8700-8707.
-

-
- Costa, V. and Moradas-Ferreira, P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* **22**: 217-246.
- D'Angio, C.T. and Finkelstein, J.N. (2000). Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Mol. Genet. Metabol.* **71**: 371-380.
- de Bruin, E.C., Werten, M.W., Laane, C. and de Wolf, F.A. (2002). Endogenous prolyl 4-hydroxylation in *Hansenula polymorpha* and its use for the production of hydroxylated recombinant gelatin. *FEMS Yeast Res.* **1**: 291-298.
- Duyndam, M.C., Hulscher, T.M., Fontijn, D., Pinedo, H.M., Boven, E. (2001). Induction of vascular endothelial growth factor expression and hypoxia-inducible factor 1 α protein by the oxidative stressor arsenite. *J. Biol. Chem.* **276**: 48066–48076.
- Ebert, B.L., Firth, J.D. and Ratcliffe, P.J. (1995). Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct cis-acting sequences. *J. Biol. Chem.* **270**: 29083-29089.
- Elbert, B.L. and Bunn, H.F. (1998). Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding proteins. *Mol. Cell Biol.* **18**: 4089-4096.
- Elkon, R., Linhart, C., Sharan, R., Shamir, R. and Shiloh, Y. (2003). Genome-wide *in silico* identification of transcriptional regulators controlling the cell cycle in human cells. *Genome Res.* **13**: 773–780.
- Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G. and Flamme, I. (2003). Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J. Biol. Chem.* **278**: 7520-7530.
-

-
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J. and Sogawa, K. (1999). Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: Their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO. J.* **18**: 1905-1914.
- Ema, M., Morita, M., Ikawa, S., Tanaka, M., Matsuda, Y., Gotoh, O., Saijoh, Y., Fujii, H., Hamada, H., Kikuchi, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (1996). Two new members of the murine Sim gene family are transcriptional repressors and show different expression patterns during mouse embryogenesis. *Mol. Cell Biol.* **16**: 5865-5875.
- Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (1992). cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 246–253.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 4273-4278.
- Emerling, B.M. and Chandel, N.S. (2005). Oxygen sensing: Getting pumped by sterols. *Sci. Stke.* 289, pe30.
- Fandrey, J., Gorr, T.A. and Gassmann, M. (2006). Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovascular Res.* **71**: 642-651.
- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G. and Semenza, G.L. (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* **59**: 3915–3918.
- Finkel, T (2001). Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB Life.* **52**: 3–6.
- Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y.D., Ellis, L.M. and Semenza, G.L. (2002). Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular
-

endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 38205–38211.

Gao, N., Jiang, B.H., Leonard, S.S., Corum, L., Zhang, Z., Roberts, J.R., Antonini, J., Zheng, J.Z., Flynn, D.C., Castranova, V. and Shi, X. (2002). p38 signaling-mediated hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor induction by Cr(VI) in DU145 human prostate carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 45041–45048.

Gassmann, M., Kvietikova, I., Rolfs, A. and Wenger, R.H. (1997). Oxygen- and dioxin-regulated gene expression in mouse hepatoma cells. *Kidney Int.* **51**: 567-574.

Ghibelli, L., Coppola, S., Rotilio, G., Lafavia, E., Marisca, V. and Ciriolo, M.R. (1995). Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**: 313-320.

Giaccia, A., Siim, B.G. and Johnson, R.S. (2003). HIF-1 as a target for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**: 803-811.

Gille, G. and Sigler, K. (1995). Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol.* **40**: 131-152.

Gingras, A.C, Raught, B. and Sonenberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* **15**: 807–826.

Goffeau, A., Barrel, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science.* **274**: 563-567.

Görlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V.B., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R.P., Kietzmann, T. and Busse, R. (2001). Thrombin activates the

hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smoothmuscle cells: role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ. Res.* **89**: 47–54.

Gothie, E., Richard, D.E., Berra, E., Pages, G. and Pouyssegur, J. (2000). Identification of alternative spliced variants of human hypoxic -inducible factor-1alpha. *J. Biol. Chem.* **275**: 6922-6927.

Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R.H., Kivietikova, I., Whitelaw, M.L., Toftgård, R., Tora, L., Gassmann, M. and Poellinger, L. (1996). Funcional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **16**: 5221-5231.

Gralla, E.B. and Valentine, J.S. (1991). Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation *Res. J. Bacteriol.* **173**: 5918-5920.

Graven, K.K., Troxler, R.F., Kornfeld, H., Panchenko, M.V. and Farber, H.W. (1994). Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **269**: 24446–24453.

Graven, K.K., Yu, Q., Pan, D., Roncarati, J.S. and Farber, H.W. (1999). Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim. Biophys. Acta.* **1447**: 208–218.

Green, D.R. and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science.* **281**: 1309-1312.

Güldener, U., Münsterkötter, M., Kastenmüller, G., Strack, N., van Helden, J., Lemer, C., Richelles, J., Wodak, S.J., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J. E., Michael, H., Kaps, A., Talla, E., Dujon, B., André, B., Souciet, J. L., De Montigny, J., Bon, E., Gaillardin, C. and Mewes, H.W. (2005). CYGD: the Comprehensive Yeast Genome Database. *Nucleic Acids Res.* **33**: D364-D368.

-
- Gupta, K., Kshirsagar, S. Li, W., Gui, W., Ramakrishnan, S., Gupta, P. Law, P.Y. and Hebbel, R.P. (2000). VEGF prevents apoptosis of H microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp. Cell Res.* **247**: 495-504.
- Heidbreder, M., Frohlich, F., Jöhren, O., Dendorfer, A., Qadri, F., Dominiak, P. (2003). Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *FASEB J.* **17**:1541-1543.
- Helden, J.V., André, B. and Collado-Vides, J. (2000). Yeast functional analysis report. A web site for the computational analysis of yeast regulatory sequences. *Yeast.* **16**: 177-187.
- Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J. and Jelkmann, W. (1999). Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- β stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* **94**: 1561–1567.
- Hertzberg, L., 2003. Probabilistic motif searching. Thesis for the M.S.c. Degree. Weizmann Institute of Science. Israel.
- Hertzberg, L., Zuk, O., Getz, G. and Domany, E. (2005). Finding motifs in promoter regions. *J. Comput. Biol.* **12**: 314–330.
- Hirota, K., Fukuda, R., Takabuchi, S., Kizaka-Kondoh, S., Adachi, T., Fukuda, K. and Semenza, G. (2004). Induction of hypoxia-inducible factor 1 activity by muscarinic acetylcholine receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **279**: 41521–41528.
- Ho, V. T. and Bunn, H. F. (1996). Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: Further evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **223**: 175–180.
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A. and Hankinson, O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science.* **252**: 954-958.
-

-
- Holland, J.P., Labieniec, L., Swimmer, C. and Holland, M.J. (1983). Homologous nucleotide sequences at the 5' termini of messenger RNAs synthesized from the yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families. The primary structure of a third yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* **258**: 5291-5299.
- Holland, M.J., Holland, J.P., Thill, G.P. and Jackson, K.A. (1981). The primary structures of two yeast enolase genes. Homology between the 5' noncoding flanking regions of yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J. Biol. Chem.* **256**: 1385-1395.
- Höpfel, G., Ogunshola, O and Gassmann, M. (2004). HIFs and tumors - causes and consequences. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**: R608–R623.
- Hu, C.J., Wang, L.Y., Chodosh, L.A., Keith, B. and Simon, M.C. (2003). Differential roles of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell Biol.* **23**: 9361-9374.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M. and Bunn, H.F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* **271**: 32253–32259.
- Huang, L.E. and Bunn, H.F. (2003). Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J. Biol. Chem.* **14**:14.
- Hughes, J.D., Estep, P.W., Tavazoie, S. and Church, G.M. (2000). Computational identification of cis-regulatory elements associated with groups of functionally related genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **296**: 1205–1214.
- Hur, E., Chang, K.Y., Lee, E., Lee, S.K. and Park, H. (2001). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor- 1alpha. *Mol. Pharmacol.* **59**: 1216–1224.
-

-
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S. and Núñez, G. (1997). *harakiri*, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X_L. *EMBO J.* **16**: 1686-1694.
- Isaacs, J.S., Jung, Y-J. and Neckers, L. (2004). Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator (ARNT) Promotes Oxygen independent Stabilization of Hypoxia-inducible Factor-1 α by Modulating an Hsp90-dependent Regulatory Pathway. *J. Biol. Chem.* **279**: 16128–16135.
- Iyer, N.V., Leung, S.W. and Semenza, G.L. (1998). The hypoxia-inducible factor 1 α gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics.* **52**: 159-165.
- Jackson, F.R., Bargiello, T.A., Yun, S.H. and Young, M.W. (1986). Product of per locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. *Nature.* **320**:185-188.
- Jamieson, D.J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **14**: 1511-1527.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J. and Kim, K.W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* **111**: 709-720.
- Jiang, B.H., Agani, F., Passaniti, A., and Semenza, G.L. (1997). V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.* **57**: 5328–5335.
- Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R. and Semenza, G.L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**: 17771-17778.
- Jiang, Y., M.J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C.E. and Goldberg, M.A (2001). *MGA2* Is Involved in the Low-Oxygen Response Element-Dependent Hypoxic Induction of Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel Biol.* **21**: 6161-6169.
-

- Johnson, B., Brooks, B.A., Heinzmann, C., Diep, A., Mohandas, T., Sparkes, R.S., Reyes, H., Hoffman, E., Lange, E. and Gatti, R.A. (1993). The Ah receptor nuclear translocator gene (ARNT) is located on q21 of human chromosome 1 and on mouse chromosome 3 near Cf-3. *Genomics*. **3**: 592-598.
- Jürgensmeier, J.M., Krajewski, S., Armstrong, R.C., Wilson, G.M., Olterdorf, T., Fritz, L.C., Reed, J.C. and Otilie, S. (1997). Bax- and Bak-induced cell death in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell*. **8**: 325-339.
- Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A. (1994). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 207-210.
- Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Örd, T. and Bredesen, D.E. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*. **262**: 1274-1277.
- Kim, M.S., Kwon, H.J., Lee, Y.M., Baek, J.H., Jang, J.E., Lee, S.W., Moon, E.J., Kim, H.S., Lee, S.K., Chung, H.Y., Kim, C.W. and Kim, K.W. (2001). Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat. Med.* **7**: 437-443.
- Kim, C.H., Cho, Y.S., Chun, Y.S., Park, J.W., Kim, M.S. (2002). Early expression of myocardial HIF-1 α in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Circ. Res.* **90**: E25–E33.
- Knowles, H. and Harris, A.L. (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia and tumorigenesis. *Breast cancer Res.* **3**: 318-322.
- Kondo, K., Klco, J., Nakamura, E., Lechpammer, M. and Kaelin, W.G. (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel Lindau protein. *Cancer Cell*. **1**: 237-246.
- Krantz, S.B. (1991). Erythropoietin. *Blood*. **77**: 419-443.

-
- Kvietikova, I., Wenger, R.H., Marti, H.H. and Gassmann, M. (1995). The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to hypoxia-inducible factors (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Research*. **23**: 4542-4550.
- Kwast, K.E., Burke, P.V., Staahl, B.T. and Poyton, R.O. (1999). Oxygen sensing in yeast: Evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 5447-5451.
- Kwon, S.J., Song, J.J. and Lee, Y.J. (2005). Signal pathway of hypoxia-inducible factor alpha phosphorylation and its interaction with von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during ischemia in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **11**: 7607-7613.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L. and Bruick, R.K. (2002a). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* **16**: 1466-1471.
- Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J. and Whitelaw, M.L. (2002b). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*. **295**: 858-861.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C. and Semenza, G.L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell Biol.* **21**: 3995–4004.
- Lee, J-W., Bae, S-H., Jeong, J-W., Kim, S-H and Kim, K-W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stabilization and biological functions. *Exp. Mol. Med.* **36**: 1-12.
- Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S. and Goldberg, M.A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **270**: 13333-13340.
-

-
- Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T. and Kourembanas, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* **77**: 638-643.
- Longo, V.D., Gralla, E.B. and Valentine, J.S. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 12275-12280.
- Lu, S., Gu, X., Hoestje, S. and Epner, D.E. (2002). Identification of an additional hypoxia responsive element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Biochim. Biophys. Acta* **1574**: 152-156.
- Mack, F.A., Rathmell, W.K., Arsham, A.M., Gnarr, J., Keith, B. and Simon, M.C. (2003). Loss of pVHL is sufficient to cause HIF dysregulation in primary cells but does not promote tumor growth. *Cancer Cell.* **3**: 75-88.
- Mager, W.H. and Ferreira, P.M. (1993). Stress response of yeast. *Biochem. J.* **290**: 1-13.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A. and Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain is a negative regulator of hypoxia inducible gene expression. *Nature.* **414**: 550-554.
- Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.S., Tanaka, H. and Poellinger, L. (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus. *J. Biol. Chem.* **277**: 32405-32408.
- Maranchie, J.K., Vasselli, J.R., Riss, J., Bonifacino, J.S., Linehan, W.M. and Klausner, R.D. (2002). The contribution of VHL substrate binding and HIF-1 α to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell.* **1**: 247-255.
- Matys, V., Fricke, E., Geffers, R., Gößling, E., Haubrock, M., Hehl, R., Hornischer, K., Karas, D., Kel, A.E., Kel-Margoulis, O.V., Kloos, D.-U., Land, S., Lewicki-Potapov, B., Michael, H., Münch, R., Reuter, I., Rotert, S., Saxel, H., Scheer, M., Thiele, S.
-

- and Wingender, E. (2003). TRANSFAC1: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res.* **31**: 374-378.
- Maxwell, P.H., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Nicholls, L.G., Harris, A.L., Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (1997). Hypoxia inducible factor-1 modulated gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 8104-8109.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. and Ratcliffe, P.J. (1999). The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factor for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* **399**: 271-275.
- Maynard, M.A., Qi, H., Chung, J., Lee, E.H.L., Kondo, Y., Hara, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W. and Ohh, M. (2003). Multiple splice variants of the human HIF-3 α locus are targets of the von hippel-lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J. Biol. Chem.* **278**:11032–11040.
- Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J.H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W.Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W., Acker, H. and Fandrey, J. (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J. Cell Sci.* **116**: 1319–1326.
- Meyer-Siegler, K., Mauro, D.J., Seal, G., Wurzer, J., deRiel, J.K. and Sirover, M.A. (1991). A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 8460–8464.
- Miller, C.A.III. (1997). Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast: activation of transcription by indole compounds. *J. Biol. Chem.* **272**: 32824–32829.
-

-
- Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Piret, J.P., Barbieux, A., Raes, M. and Michiels, C. (2001). c-JUN gene induction and AP-1 activity is regulated by a JNK-dependent pathway in hypoxic HepG2 cells. *Exp. Cell. Res.* **265**: 114–124.
- Minet, E., Mottet, D., Michel, G., Roland, I., Raes, M., Remacle, J. and Michiels, C. (1999). Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction. *FEBS Letters.* **160**: 251-256.
- Mottet, D., Dumont, V., Deccache, Y., Demazy, C., Ninane, N., Raes, M. and Michiels, C. (2003). Regulation of HIF-1 α protein level during hypoxic conditions by the PI3K/AKT/GSK3 pathway in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 31277–31285.
- Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S., Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor 1 α . *J. Biol. Chem.* In press.
- Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A. Jr. and Crews, S.T. (1991). The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell.* **67**: 1157-1167.
- Parisi, M., Xu, B. and Clayton, D.A. (1993). A Human mitochondrial transcriptional activator can functionally replace a yeast mitochondrial HMG-box protein both in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1951 – 1961.
- Piret, J.P., Mottet, D., Raes, M. and Michiels, C. (2002). Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem.Pharmacol.* **64**: 889-892.
- Pouyssegur, J., Volmat, V. and Lenormand, P. (2002). Fidelity and spatiotemporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem. Pharmacol.* **64**: 755–763.
-

-
- Poveda, A., Pamblanco, M., Tafrov, S., Tordera, V., Sternglanz, R. and Sendra, R. (2004). Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus. *J. Biol. Chem.* **279**: 16033–16043.
- Poyton, R.O. and Burke, P.V. (1992). Oxygen regulated transcription of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **1101**: 252-256.
- Pugh, C.W., Gleadle, J. and Maxwell, P. (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia signalling pathways. *Breast Cancer Res.* **3**: 313-317.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: New, fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucl. Acids. Res.* **23**: 4878–4884.
- Raff, M. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature.* **396**: 119-122.
- Rampling, R., Cruickshank, G., Lewis, A.D., Fitzsimmons, S.A. and Workman, P. (1994). Direct measurement of pO₂ distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **29**: 427–431.
- Raught, B., Gingras, A.C. and Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 7037–7044.
- Rees, B.B., Bowman, J.A. and Schulte, P.M. (2001). Structure and sequence conservation of a putative hypoxia response element in the lactate dehydrogenase-B gene of *Fundulus*. *Biol. Bull.* **200**: 247-251.
- Richard, D.E., Berra, E. and Pouyssegur, J. (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 26765–26771.
- Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D. and Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-
-

- 1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* **274**: 32631–32637.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. and Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature.* **370**: 527–532.
- Sabová, L., Zeman, I., Supek, F. and Kolarov, J. (1993). Transcriptional control of AAC gene encoding mitochondrial ADP/ATP translocator in *Saccharomyces cerevisiae* by oxygen, heme and ROX1 factor. *Eur. J. Biochem.* **213**: 547-553.
- Salomon-Nguyen, F., Della-Valle, V., Mauchauffe, M., Busson-Le, C.M., Ghysdael, J., Berger, R. and Bernard, O.A. (2000). The t(1;12)(q21;p13) translocation of human acute myeloblastic leukemia results in a TEL-ARNT fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 6757-6762.
- Sang, N., Stiehl, D.P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V. and Caro, J. (2003). MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J. Biol. Chem.* **278**: 14013–14019.
- Scheel, J., Hussong, R., Schrenk, D. and Schmitz, H.J. (2002). Variability of the human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) gene. *J. Hum. Genet.* **5**: 217-224.
- Semenza, G.L. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**: 32529-32537.
- Semenza, G.L. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem. Pharmacol.* **59**: 47-53.
- Semenza, G.L. (2001). Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *TRENDS in Molecular Medicine.* **7**: 345-350.
-

-
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **3**: 721-732.
- Semenza, G.L., Neufeldt, M.K., Chi, S.M. and Antonarakis, S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 5680-5684.
- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.-M. and Wang, G.L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **269**: 23757-23763.
- Semenza, G.L. and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* **12**: 5447-54.
- Shemirani, B. and Crowe, D.L. (2002). Hypoxic induction of HIF-1 α and VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma lines is mediated by stress activated protein kinases. *Oral Oncol.* **38**: 251–257.
- Sirover, M.A. (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1432**: 159–184.
- Soitamo, A.J., Rabergh, C.M., Gassmann, M., Sistonen, L. and Nikinmaa, M. (2001). Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. *J. Biol. Chem.* **276**: 19699-19705.
- Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H. and Harris, A.L. (2001). HIF-1-dependent regulation of hypoxia induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res.* **61**: 6669-6673.
- Sowter, H.M., Raval, R., Moore, J., Ratcliffe, P.J. and Harris, A.L. (2003). Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1 α versus Hif-
-

-
- 2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res.* **63**: 6130-6134.
- Steels, E.L., Learmonth, R.P. and Watson, K. (1994). Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiol.* **140**: 569-576.
- Stiehl, D.P., Jelkmann, W., Wenger, R.H. and Hellwig-Burgel, T. (2002). Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett.* **512**:157–162.
- Suzuki, H., Tomida, A. and Tsuruo, T. (2001). Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1 alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene.* **20**: 5779-5788.
- Swanson, H.I., Chan, W.K. and Bradfield, C.A. (1995). DNA Binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J. Biol. Chem.* **270**: 26292-26302.
- Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N. and Fujii-Kuriyama, Y. (1998). Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**:789-794.
- Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. and Poellinger, L. (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* **19**: 4298-4309.
- ter Linde, J.J.M.T., Liang, H., Davis., R.W., Steensma, H.Y., Dijken. J.P.V. and Pronk, J.T. (1999). Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**: 7409-7413.
-

-
- Thijs, G., Marchel, K., Lescot, M., Rombauts, S., Moor, B.D., Rouze, P. and Moreau, Y. (2002). A Gibbs sampling method to detect overrepresented motifs in the upstream regions of coexpressed genes. *J. Comp. Biol.* **9**: 447–464.
- Tian, H., Mcknight, S.L. and Russel, D.W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1, a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* **11**: 72-82.
- Turton, H.E., Dawes, I.W. and Grant, C.M. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1-mediated adaptative response to malondialdehyde. *J. Bacteriol.* **179**: 1096-1101.
- Vasconcelles, M.J., Jiang, Y., McDaid, K., Gilooly, L., Wretzel, S., Porter, D.L., Martin, C.E. and Goldberg, M.A. (2001). Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes. Implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **276**: 14374-14384.
- Vivanco, I. and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **2**: 489–501.
- Volm, M. and Koomagi, R. (2000). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res.* **20**: 1527–1533.
- Wang, G.L., Jiang, B-H., Rue, E.A. and Semenza, G.L. (1995a). Hypoxia-inducible factor is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 5510-5514.
- Wang, G.L., Jiang, B-H. and Semenza, G.L. (1995b). Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**: 550-556.
-

-
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **268**: 21513-21518.
- Welsh, S.J., Bellamy, W.T., Briehl, M.M. and Powis, G. (2002). The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **62**: 5089–5095.
- Wenger, R.H. and Gassmann, M. (1997). Oxygen(es) and hypoxia-inducible factor-1. *Biol. Chem.* **378**: 609-616.
- Wenger, R.H., Stiehl, D.P. and Camenisch., G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci. Stke.* re12.
- Whiteway, M. and Szostak, J.W. (1985) The ARD1 gene of yeast functions in the switch between the mitotic cell cycle and alternative developmental pathways. *Cell.* **43**: 483-492.
- Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.G., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Maxwell, P.H. (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood.* **92**: 2260–2268.
- Woo, K.J., Lee, T.J., Park, J.W. and Kwon, T.K. (2006). Desferrioxamine, and iron chelator, enhances HIF-1 alpha accumulation via cyclooxygenases-2 signalling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**: 8-14.
- Xavier, M.A.S. (2003). Desenvolvimento de tecnologia para produção de calcitonina humana por engenharia genética. Universidade de Brasília. Instituto de Biologia. Departamento de Biologia Celular. Brasília-Distrito Federal.
-

-
- Yang, Z.Z., Zhang, A.Y., Yi, F.X., Li, P.L. and Zou, A.P. (2003). Redox state regulation of HIF-1 alpha levels and HO-1 expression in renal medullary interstitial cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **284**: F1207-F1215.
- Yasinska, I.M. and Sumbayev, V.V. (2003). S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* **549**: 105–109.
- Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B.Z., Rubinstein, M. and Cohen, B. (1998). Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor, HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J.* **17**: 5085–5094.
- Zitomer, R. and Lowry, C.V. (1992). Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **56**: 1-11.
-



The yeast genome may harbor hypoxia response elements (HRE)[☆]

Túlio César Ferreira^a, Libi Hertzberg^{b,c}, Max Gassmann^d, Élide Geralda Campos^{a,*}

^a *Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900, Brazil*

^b *Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel*

^c *Department of Physics of Complex Systems, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel*

^d *Institute of Veterinary Physiology, Vetsuisse Faculty and Zurich Center for Integrative Human Physiology (ZIHP), University of Zurich, Winterthurerstrasse 260, CH-8057, Zurich, Switzerland*

Received 8 May 2006; received in revised form 22 August 2006; accepted 28 August 2006

Abstract

The hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a heterodimeric transcription factor activated when cells are submitted to hypoxia. The heterodimer is composed of two subunits, HIF-1 α and the constitutively expressed HIF-1 β . During normoxia, HIF-1 α is degraded by the 26S proteasome, but hypoxia causes HIF-1 α to be stabilized, enter the nucleus and bind to HIF-1 β , thus forming the active complex. The complex then binds to the regulatory sequences of various genes involved in physiological and pathological processes. The specific regulatory sequence recognized by HIF-1 is the hypoxia response element (HRE) that has the consensus sequence 5'-BRCGTGVBBB3'. Although the basic transcriptional regulation machinery is conserved between yeast and mammals, *Saccharomyces cerevisiae* does not express HIF-1 subunits. However, we hypothesized that baker's yeast has a protein analogous to HIF-1 which participates in the response to changes in oxygen levels by binding to HRE sequences. In this study we screened the yeast genome for HREs using probabilistic motif search tools. We described 24 yeast genes containing motifs with high probability of being HREs (p -value < 0.1) and classified them according to biological function. Our results show that *S. cerevisiae* may harbor HREs and indicate that a transcription factor analogous to HIF-1 may exist in this organism.

© 2006 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Anaerobic genes; Gene annotation; HIF-1; HRE; Hypoxia; LORE; Regulatory sequence; Yeast

1. Introduction

Mammalian cells require molecular oxygen to perform essential metabolic processes, including oxidative phosphorylation, in which oxygen functions as a final acceptor of electrons during ATP production. To maintain homeostasis, cells respond to

Abbreviations: ARNT, aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator; HBS, HIF-1 binding site; HIF-1, hypoxia-inducible factor-1; HRE, hypoxia response element; LORE, low oxygen responsive element.

[☆] This paper is part of the 4th special issue of CBP dedicated to The Face of Latin American Comparative Biochemistry and Physiology organized by Marcelo Hermes-Lima (Brazil) and co-edited by Carlos Navas (Brazil), Rene Belebani (Brazil), Rodrigo Stabeli (Brazil), Tania Zenteno-Savín (Mexico) and the editors of CBP. This issue is dedicated to the memory of two exceptional men, Peter L. Lutz, one of the pioneers of comparative and integrative physiology, and Cicero Lima, journalist, science lover and Hermes-Lima's dad.

* Corresponding author. Tel.: +55 61 3307 2423; fax: +55 61 3349 8411.

E-mail address: elida@unb.br (É.G. Campos).

extra- and intracellular stimuli, of which hypoxia is one of the most important. Oxygen homeostasis is crucial for all mammalian cells, since low or high levels of oxygen can cause cell damage. One of the first studies of transcriptional regulation by hypoxia had as its focus the maintenance of blood erythropoietin (EPO) levels. A *cis*-acting regulatory sequence was found in the 3' flanking region of the human EPO gene and called hypoxia response element (HRE) (Wang and Semenza, 1993). The transcription factor that recognizes this HRE is the hypoxia inducible factor 1 (HIF-1). The consensus HRE has the sequence 5'-BRCGTGVBBB-3', where the RCGTG core is the HIF-1 binding site (HBS). HIF-1 plays a key role in physiological and pathological processes in humans, including iron homeostasis, energy metabolism, angiogenesis, cell proliferation and viability, cancer, cerebral ischemia, pulmonary hypertension, intra-uterine fetal growth retardation, preeclampsia, and myocardial ischemia (reviewed by Fandrey et al., 2006).

The hypoxia-inducible factor-1 functions as a heterodimer, formed by the subunits HIF-1 α and the constitutively expressed aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT, also referred as HIF-1 β) (Chilov et al., 1999). HIF-1 α is unique to the hypoxia response, whereas HIF-1 β acts as a dimerization partner also for other transcription factors, among them the aryl-hydrocarbon receptor (AhR, dioxin receptor) (Gassmann et al., 1997). Both subunits belong to the “basic-helix–loop–helix-PAS” (bHLH-PAS) family of transcription factors (Wang et al., 1995). Both stability and activity of HIF-1 are regulated by post-translational modifications such as phosphorylation, S-nitrosation, hydroxylation and acetylation (Jeong et al., 2002; Brahimi-Horn et al., 2005). Under normal oxygen tension, hydroxylated HIF-1 α is recognized by the VHL (von Hippel-Lindau) factor, a tumor suppressor protein. When bound to VHL, HIF-1 α is degraded by proteolysis via the 26S proteasome after being polyubiquitinated. This mechanism prevents the transcriptional activation of HIF-1 target genes (Maxwell et al., 1999).

When cells are challenged with low oxygen levels, stable HIF-1 α and ARNT translocate into the nucleus, form the heterodimer and bind to the DNA recognition site leading to the expression of several target genes, of which over one hundred have been described, including EPO, vascular endothelial growth factor, glycolytic enzymes such as phosphoglycerate kinase, phosphofructokinases 1 and 2, hexokinases 1 and 2, enolase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, as well as proteins that participate in iron metabolism (Semenza et al., 1994; Ebert et al., 1995). HIF-1 is a major oxygen regulator. Based on microarray results Wenger et al. (2005) estimated that there may be at least 200 different mammalian HIF-regulated genes, although not all of them are likely to be directly regulated by HRE motifs in their promoter regions. Rather, other oxygen-regulated, HIF-dependent or independent transcription factors might be responsible for their hypoxic induction. A single core HRE is insufficient for gene activation in response to hypoxia. Normally, a functional HRE contains flanking motifs where other transcription factors and co-activators bind to regulate transcription (Wenger et al., 2005).

Members of bHLH-PAS family of proteins with high homology to human HIF-1 α have been cloned from several organisms, including mouse, rat, squirrel, chimpanzee, rabbit, tundra vole, chiru, the african clawed frog (*Xenopus*), the fruit fly, and particularly from several fish species (source: GenBank). The role of HIF-1 in fish response to hypoxia is beginning to emerge. For instance, HIF-1 α mRNA from the rainbow trout is constitutively expressed and shows no change during a two-hour hypoxia treatment (Soitamo et al., 2001). Rees et al. (2001) have found a putative HRE in the lactate dehydrogenase-B (LDH-B) gene of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. The activity of LDH-B increases twofold during exposure of *F. heteroclitus* to hypoxia. To this point there are no reports of hypoxia-inducible factor-1 in unicellular organisms.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a single-celled eukaryote, is a facultative anaerobe which respire in the presence of oxygen but ferments under anaerobic conditions. Many yeast genes vary their expression when cells experience different concentrations of oxygen, which enables them to regulate

efficiently the metabolism towards one of the two alternative energy-producing pathways (Zitomer and Lowry, 1992). In mammals, stabilization and activation of HIF-1 α begin when the concentration of oxygen reaches approximately 5%, with maximal expression at 0.5% O₂ (Jiang et al., 1996). By comparison, in yeast expression of genes responsive to hypoxia starts at 0.2% O₂ (Kwast et al., 1999; Emerling and Chandel, 2005). *S. cerevisiae* proteins such as those involved in the respiratory chain, heme synthesis, sterol uptake and unsaturated fatty acid metabolism have their expression level affected by different levels of oxygen (Poyton and Burke, 1992; Burke et al., 1997; Kwast et al., 1999; Vasconcelles et al., 2001; Alimardani et al., 2004). For instance, *ANB1* is up-regulated under anaerobiosis, which is mediated mainly by the ROX1p protein. The same effect of oxygen has been demonstrated for several genes, such as *COX5b* and *CYC7*, involved in respiration (Zitomer and Lowry, 1992); *AAC3* (Sabová et al., 1993), responsible for the mitochondrial ATP/ADP translocator expression; *HEM13*, which participates in heme metabolism (Amillet et al., 1996); and *OLE1*, which encodes $\Delta 9$ fatty acid desaturase (Vasconcelles et al., 2001). In *S. cerevisiae*, a consensus sequence named LORE (low oxygen response element; 5'-ACTCAACAA-3') controls the expression of several genes under hypoxia and has been so far identified and characterized in the promoter region of *OLE1*. The LORE consensus sequence, although functionally similar to the hypoxia responsive element (HRE) of mammalian genes, differs from it in terms of structure (Vasconcelles et al., 2001). The existence of HRE in yeast has never been described.

Despite the increase in the understanding of the transcriptional regulation of genes responsive to oxygen levels in eukaryotic cells in late years, many aspects remain to be explained, including those regarding oxygen sensors. Some aspects of the oxygen sensing mechanism may be elucidated through studies in yeast, since this mechanism seems to be highly conserved among eukaryotes (Vasconcelles et al., 2001). We think that *S. cerevisiae* may have an HIF-1 analogue because, when we applied the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using as a probe the double-stranded oligonucleotide W18 that contains the HRE from the enhancer of the human erythropoietin gene, DNA-binding activity was observed under hypoxia conditions. Therefore, the objective of the present study was to search for possible HREs in the yeast genome. We described the putative HRE motifs found in upstream regulatory regions of *S. cerevisiae* genes using available bioinformatics tools (RSAT and TRANSFAC). We also show that several yeast genes have HRE clusters. Based on this finding it is conceivable that *S. cerevisiae* has a transcription factor that acts through HRE and therefore is the functional analogue of human HIF-1.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strain and growth conditions

The *S. cerevisiae* strain EG103 (DBY746; *MAT α leu2-3,112 his3 $\Delta 1$ trp1-289 ura3-52 GAL⁺*) was obtained with Dr. Edith

Butler Gralla (University of California, Los Angeles, USA). Cells were usually grown in SC medium, consisting of 0.67 % (w/v) yeast nitrogen base (YNB), 0.5% (NH₄)₂SO₄ (w/v) and 2% (w/v) glucose as carbon source and supplemented with amino acids, adenine and uracil, as described (Kaiser et al., 1994), as well as a fourfold excess of the supplements tryptophan, uracil, adenine, methionine and histidine (Gralla and Valentine, 1991). For normal aeration cells were grown in liquid medium using a flask/medium volume ratio of 5:1. The cells were cultured until the OD₆₀₀ was between 2 and 3, which corresponds to the logarithmic growth phase. For low oxygen conditions cells were inoculated into 50-ml flasks in liquid medium using a flask/medium volume ratio of 10:9. The flasks were sealed with rubber cap; inside pressure was avoided through a needle connecting the inner and outer sides. The cultures were incubated with no agitation at 30 °C. To ensure that the cells were cultured under low levels of oxygen the partial O₂ pressure was measured in the flask of the culture during the cell growth using an OxyLite® 2000 (Oxford Optrox).

2.2. Protein extract preparation

The cells were collected by centrifugation at 2.500 ×g for 5 min at 4 °C. The pellets were washed three times with distilled water and resuspended in four volumes (w/v) of cold lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 50 mM KCl) containing proteinase inhibitors (10 µg/mL pepstatin, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin and 1 mM PMSF). Yeast total extracts were obtained by cell disruption using 0.5-mm glass beads (acid-washed). The cell suspensions were vigorously mixed in the vortex 30 times for 30 s with 30-second intervals on ice. The lysates were collected and transferred to new 1.5-mL centrifuge tubes. The glass beads were washed with lysis buffer and the washing solution was pooled with the lysates. The sample was centrifuged at 13.000 ×g for 30 min at 4 °C. The supernatants were collected, divided into aliquots and stored at –80 °C. The whole yeast cell lysates were used for EMSA experiments.

2.3. Protein concentration determination

Protein concentrations were determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin as a standard.

2.4. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

For EMSA experiments the double-stranded W18 oligonucleotide (sense strand, 5'-gccct**actgtg**ctgtctca-3'), which contains the HRE (bold) from the enhancer of the human erythropoietin gene, was used as probe (Semenza and Wang, 1992). Twenty nanograms of annealed W18 were 5' end-labeled with 25 µCi [γ-³²P]ATP (GE Healthcare) using 10 units of T4 polynucleotide kinase (Promega). DNA-protein binding reactions were carried out for 1.5 h at 4 °C in a total volume of 25 µL containing 50 µg total yeast protein extract, 0.3 µg poly-(dI-dC) oligonucleotide (GE Healthcare) and 150.000 cpm. oligonucleotide probe in binding buffer [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM

KCl, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 5% glycerol (v/v)] and run on a 5% non-denaturing polyacrylamide gel. Electrophoresis was performed at 200 V in TBE buffer (44.5 mM Tris, 44.5 mM boric acid, 2.5 mM EDTA) at 4 °C for 2.5 h. The gel was dried at 80 °C for 1 h and exposed to a Storage Phosphor Screen and scanned in a Typhoon® 9210 (GE Health Science).

2.5. Search for putative human HRE motifs in the yeast genome

The online bioinformatics tool *Regulatory Sequence Analysis Tool* — RSAT (Helden et al., 2000) was used for searching matching positions of the putative binding site HRE (hypoxia response element) and low oxygen responsive element (LORE) in the yeast genome. The *Genome-scale DNA-pattern (strings)* option was used for this analysis. We used the mammalian consensus sequence 5'-BRCGTGVBBB-3' (Wenger and Gassmann, 1997) as standard matching option for HRE and 5'-ACTCAACAA-3' for LORE. In HRE sequence B represents the nucleotides C, G or T, R represents A or G, and V represents A, C or G. We chose the following parameters in the RSAT search: exclusion of matches that overlap any upstream ORF,

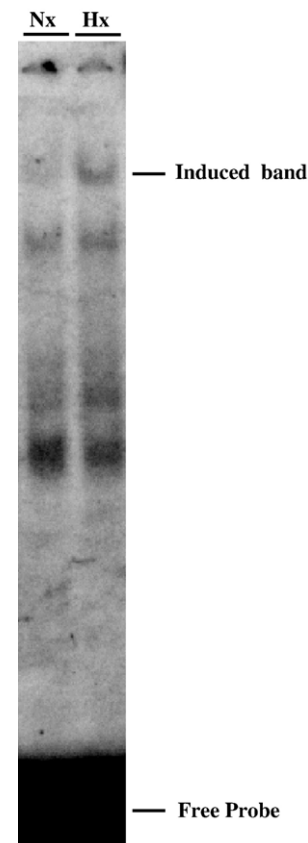


Fig. 1. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed using the end-labelled EPO probe in a 5% native polyacrylamide gel. Each reaction contained 150.000 c.p.m. of EPO probe, 0.3 µg of poly (dI-dC) and 50 µg of yeast total extract. The source of yeast total extract used in each reaction is indicated: EG103 incubated under normoxia (Nx) or hypoxia (Hx) conditions (0.36 mmHg). The endogenous protein induced under hypoxia conditions that binds to the DNA recognition site is indicated. The experiment was repeated twice.

Table 1 (continued)

Gene name	Sequence (5'→3')	Location	p-value
TPS1	<u>gctgacgtgcttgg</u>	[−383:−370]	0.070
	<u>cgggcgtggtgc</u>	[−578:−567] ^a	NS
	<u>tgacgtgcttg</u>	[−78:−69] ^a	NS
USO1	<u>aaaagcacgtgacgtg</u>	[−524:−509] ^a	0.030
	<u>cgcggtgttc</u>	[−136:−127] ^a	NS
VTC3	<u>taagccacgtggggccc</u>	[−350:−335]	0.089
	<u>agcacgtcatg</u>	[−313:−302]	NS
YAP5	<u>taagtcacgtgacctc</u>	[−281:−266] ^a	0.010
	<u>ggcgtgagtc</u>	[−392:−383]	NS
YCR087C-A	<u>tatacgtgcgggt</u>	[−575:−564] ^a	0.008
	<u>aagccacgtgacgca</u>	[−443:−428] ^a	NS
YHR033W	<u>tgcgtccg</u>	[−387:−379]	0.044
	<u>taatacacgtgcccgt</u>	[−223:−208] ^a	0.034
YIL055C	<u>cgcggtgccc</u>	[−732:−724]	0.087
	<u>aaagaaacgtgtgtgt</u>	[−516:−501] ^a	NS
	<u>attaacgcgtggcggg</u>	[−676:−661] ^a	NS
YLL056C	<u>tacgtgagg</u>	[−535:−527]	0.081
	<u>tggacgtgagct</u>	[−734:−723]	NS
YLR049C	<u>tatacgtgcagc</u>	[−81:−70]	0.021
	<u>tgcgtgccc</u>	[−116:−108]	0.006
	<u>cgcggtgattt</u>	[−62:−53] ^a	NS
YLR156W ^b	<u>cgtagctgatgg</u>	[−777:−766]	0.039
	<u>tacgtgattc</u>	[−185:−176]	NS
YLR157W-D ^b	<u>cgtagctgatgg</u>	[−777:−766]	0.039
	<u>tacgtgattc</u>	[−185:−176]	NS
YLR159W ^b	<u>cgtagctgatgg</u>	[−777:−766]	0.039
	<u>tacgtgattc</u>	[−185:−176]	NS
YLR161W ^b	<u>cgtagctgatgg</u>	[−777:−766]	0.039
	<u>tacgtgattc</u>	[−185:−176]	NS
YSR3	<u>cgtagctgctcg</u>	[−188:−177]	0.020
	<u>gtggacgtgcctat</u>	[−323:−310] ^a	NS
	<u>aaagtaacgtggggac</u>	[−228:−213] ^a	NS
	<u>agatggcgtgcttctaat</u>	[−243:−234] ^a	NS
ZRT3	<u>gtacacgtgctgt</u>	[−575:−562]	0.095
	<u>tacgtgagt</u>	[−496:−488]	NS

The motifs found in *S. cerevisiae* genome were analyzed through the TRANSFAC database and the statistical validation was performed as indicated by the *p*-value.

*Note that HIF1 refers to the component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus (Poveda et al., 2004) and not to human hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1).

^a Sequences are shown in the 5'→3' direction, but the HRE motif is in the reverse complement strand. The core motifs are underlined and the genes in bold refer to those where two or more motifs were statistically significant. Motifs were considered statistically significant using an arbitrary *p*-value of 0.1. N.S.: Not significant.

^b The promoter region of these genes of unknown function are identical.

search on both DNA strands (direct and reverse complement) of the sequence upstream from the transcription start site, and default sequence length of 800 bp. We focused only on the upstream region because a preliminary search on the 3'-flanking region showed only two genes that had HRE clusters. In addition, the majority of the transcription factor binding sites in yeast are located in the 5' region. Therefore, the coding sequence and the 3' flanking region were excluded from the analysis.

2.6. Data validation

For statistical validation of the HREs found in the upstream sequences of the genes selected by RSAT analysis we used the

PWM library of Transfac and the algorithm developed by Hertzberg et al. (2005). We selected only the sequences containing HRE clusters (two or more motifs; the minimal density of the clusters in our study was 1 HRE/400 nucleotides) for *p*-value and score calculation of each motif. The score of a motif is the log-likelihood ratio, which is the log of the probability of motif occurrence given the position weight matrices (PWM), divided by the probability of random occurrence. The *p*-value calculated takes into account the random probability to get a motif with high score. More precisely, the *p*-value of each motif is the probability to get such a score or higher in a random sequence of the same length. A low *p*-value means that in a random sequence of the same length as the motif (random means A-C-G-T are uniformly distributed), the probability to get such a high score for the PWM is low. This strengthens the assumption that the motif is not there by random, but it has a biological function. A high score and a low *p*-value may indicate a high affinity of binding of the transcription factor to a promoter. According to the PWM library of Transfac, the *p*-value generated for HRE was 0.45. Because this is a high *p*-value, when selecting the sequences it was necessary to employ a lower cut-off. Usually, *p*<0.05 is used as threshold, but we arbitrarily decided on *p*<0.1. It is possible that a motif with a *p*-value greater than 0.05 is functional, because we do not know if the conventional 0.05 is the more effective *p*-value to be used when trying to select functional motifs. Because of this, our selection of motifs according to *p*-value was less restrictive (*P*<0.1). For overlapping sequences bearing the HRE core, the sequence having the lowest *p*-value was selected. For more details about PWM and *p*-value calculation, see Hertzberg (2003) and Hertzberg et al. (2005). The described functions of the selected genes were obtained at the *Saccharomyces* Genome Database (SGD). Only genes validated for two or more HREs were classified according to function.

3. Results

3.1. DNA-binding activity

To investigate whether some endogenous protein of yeast cells can recognize and bind to the HRE motif derived from the 3' enhancer of the human erythropoietin gene, we performed EMSA experiments using extracts from yeast cells submitted to normoxia and hypoxia conditions (Fig. 1). We found DNA-binding activities under normoxia and hypoxia conditions. In addition, in the samples submitted to hypoxia there was an induced band (1.6-fold) relative to the same band in the samples submitted to normoxia.

3.2. HRE clusters in the yeast genome

We used RSAT to search for putative human hypoxia response elements (HRE) in the 800-bp upstream regulatory sequences of all genes in the *S. cerevisiae* genome. From the 5.863 ORFs analyzed in the yeast database, we found 807 gene promoters containing HRE motifs. The length of all upstream sequences used for searching HRE motifs was 800 bp, since good results in this kind of search are generally obtained with

Table 2
Yeast genes harboring putative HRE clusters and listed according to biological function

Yeast gene	Gene name/description	Biological Process	HRE motifs
TDH2 ^a	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Sugar metabolism	2
ARO9	Aromatic amino acid aminotransferase II	Amino acid metabolism	4
MET3	ATP sulfurylase	Amino acid metabolism	2
MET6 ^a	5-methyltetrahydropteroyl triglutamate homocysteine methyltransferase	Amino acid metabolism	2
MET10	Sulfite reductase alpha subunit	Amino acid metabolism	2
IES5	Ino Eighty Subunit	Chromatin remodeling	2
NCE103	Carbonic anhydrase-like protein	Response to oxidative stress	2
RNR3	Ribonucleotide reductase, large (R1) subunit	DNA replication	2
SRB2	RNA polymerase II holoenzyme/mediator subunit	Telomere maintenance, transcription regulation	2
CIS3 ^a	Clk1 Suppressing	Cell wall structure	2
MNN1 ^a	Alpha-1,3-mannosyltransferase	Cell wall structure	2
GIT1	Permease involved in the uptake of glycerophosphoinositol (GroPIs)	Glycerophosphodiester transport	3
SIS2	Slit4 Suppressor	G1/S transition of mitotic cell cycle, coenzyme A biosynthesis, regulation of progression through mitotic cell cycle, response to salt stress	2
ALD6	Aldehyde dehydrogenase	Acetate biosynthesis	2
ATM1 ^a	ABC transporter	Iron ion homeostasis	2
GSH1	Gamma-glutamylcysteine synthetase	Glutathione biosynthesis	2
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1 alpha-4-beta-4 subunit	Glutamate biosynthesis, isocitrate metabolism, tricarboxylic acid cycle	2
INM1	Inositol Monophosphatase	Inositol phosphate dephosphorylation	2
NCP1 ^a	NADP-cytochrome P450 reductase	Electron transport ergosterol biosynthesis	2
SPL2	Suppressor of PLc1 deletion	Enzyme inhibitor activity	4
STB3	Sin three binding protein	Unknown	2
ICY2	ORF, Uncharacterized	Interacts with the cytoskeleton	2
YHR033W	ORF, Uncharacterized	Unknown	2
YLR049C ^a	ORF, Uncharacterized	Unknown	2

The number of statistically significant motifs for a given gene is indicated in the last column.

^a Refers to those genes found to be up-regulated in anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*.

upstream regions from -800 to -1 from the start codon. In yeast, around 99% of the known upstream elements are found within this range (source: TRANSFAC®). Since yeast genomic DNA is double-stranded, the RSAT program searched for HIF-1 binding sites on both strands, scanning in the $5' \rightarrow 3'$ direction, and recorded the best match of each sequence. We then analyzed the results and found 91 promoters containing HRE clusters (two or more motifs). After that the promoter sequences were submitted to TRANSFAC analysis for statistical validation.

3.3. Statistical validation of the results

Table 1 shows the results obtained after TRANSFAC analysis and describes 73 yeast genes that contain putative HREs. It also shows the p -values and the upstream location from the transcription start site for each gene. From the 91 sequences we analyzed, eighteen had HRE clusters in their regulatory region which were not statistically significant. The observed difference in sequence length of all motifs in Table 1 is due to the definition of PWM in TRANSFAC®.

3.4. Classification of the HRE-containing yeast genes

In a recent review published by Wenger et al. (2005), 70 known target genes regulated by hypoxia in mammals (human,

mouse and rat) were described and the authors suggested that at least 200 genes may be regulated by low levels of oxygen. The genes that were described participate on cellular processes such as oxygen supply, metabolism, cell growth and apoptosis and several of them are involved in a wide range of functions. In Table 2 we listed, according to their role in different biological processes, the total of 24 genes from Table 1 that had two or more HRE motifs validated. It is worth highlighting the presence of one gene involved in glycolysis (TDH2, which codes for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) and another involved in the tricarboxylic acid cycle (IDH1, which codes for isocitrate dehydrogenase), as well as several genes involved in amino acid metabolism.

4. Discussion

Since the description of the *S. cerevisiae* complete genome sequence (Goffeau et al., 1996) a large amount of information has been obtained on molecular responses of this yeast to different environmental conditions. Functional analysis of transcription factor binding sites through bench work (EMSA, yeast transfection) is the best approach to demonstrate the interaction and functionality of a DNA-protein complex, but it is not the only way to obtain information about those sites. After the release of the yeast genome database, the development of new computational methods has been encouraged to analyze available data and

better understand the regulatory machinery. Algorithms and tools for searching regulatory elements can be divided into two major classes: 1) methods that search for known transcription factor binding motifs (for example, by using PSSMs, like MatInspector; Quandt et al., 1995; Elkan et al., 2003; Aerts et al., 2003); 2) methods that try to detect new consensus patterns within a set of DNA sequences. MEME (Bailey and Elkan, 1995) employs an EM technique for building a common consensus from a given set of DNA sequences, while Thijs et al. (2002) and Hughes et al. (2000) use a Gibbs sampling technique to detect common patterns. In this work we used bioinformatics tools to search for motifs similar to the hypoxia response element on upstream sequences of all available yeast genes.

The collection of yeast transcription factors, their respective target genes and binding sites in CYGD (Comprehensive Yeast Genome Database) is structurally based on the TRANSFAC® database (Güldener et al., 2005), which not only contains relevant information about transcription factors (Matys et al., 2003) but also has a table with the position weight matrices (PWM), a common representation of transcription factor binding sites derived from collections of binding sites for given factors. Thus TRANSFAC® searches for the motifs in the submitted promoter sequences with the provided PWM [for more details about PWM and *p*-value calculation see Hertzberg (2003) and Hertzberg et al. (2005)].

Despite its crucial importance in the regulation of hypoxia genes, a single core within an HRE is usually considered insufficient to lead to transcription of hypoxic genes. Indeed, binding of additional factors to an HRE seems necessary for optimal hypoxic induction (Elbert and Bunn, 1998). Because transcription factors usually bind promoter regions containing clusters of a determined motif (Bailey and Noble, 2003), we considered only the sequences containing two or more motifs. However, we do not suggest that one motif in a regulatory sequence is not functional. Indeed, some genes known to respond to hypoxic stimulus contain only one functional HRE in their regulatory sequences, such as those for human and rat vascular endothelial growth factors (Liu et al., 1995; Levy et al., 1995), the murine glucose transporter 1 (Ebert et al., 1995) and phosphofructokinase L (Semenza et al., 1994), as well as some others (reviewed by Wenger and Gassmann, 1997). Some of the genes in Table 2 are involved in diverse cellular functions and others have no described function.

In this study, the gene (TDH2) coding for the yeast glycolytic enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 2 (GAPDH2) was found to contain two statistically significant HRE motifs (Tables 1 and 2). The yeast has three genes coding for this enzyme, namely GAPDH1, GAPDH2 and GAPDH3 (Holland et al., 1981, 1983). The mammalian GAPDH gene promoter has an HRE consisting of two consensus HIF-1 sites arranged as inverted repeats and separated by five base pairs and another HRE situated closer to the transcription start site (Graven et al., 1999; Lu et al., 2002). Mammalian GAPDH expression is regulated in a cell type-specific manner by a variety of factors, including hypoxia (Graven et al., 1994; Lu et al., 2002). In addition, mammalian GAPDH has diverse functions that are seemingly independent of its role in

glycolysis, such as DNA repair (Sirover, 1999; Meyer-Siegler et al., 1991). Due to the importance of glycolytic enzymes in the regulation of HIF-1 and the diverse functions of mammalian GAPDH, we think that these HREs in TDH2 greatly encourage future research to understand the role of this enzyme in the yeast response to hypoxia.

The gene transcription pattern of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *S. cerevisiae* using classical northern-blot data was studied by ter Linde et al. (1999). The authors reported that 5.738 (93%) of 6.171 open reading frames (ORF) were transcribed at detectable levels under both aerobic and anaerobic conditions. Most of the yeast genes analyzed showed similar transcript levels under aerobic and anaerobic conditions. Approximately 2.5% (140) of all analyzed genes, many of which with unknown function, were more than three times as transcribed under anaerobic conditions than under aerobic conditions. A few genes presented transcriptional induction higher than tenfold under anaerobic conditions. Some of the genes described in the above study as induced under anaerobic conditions are presented in Table 1, such as DAN1, HMS2, YSR3 (a more than threefold increase in transcription), MNN1, NCP1, RHR2 (more than twofold), ATM1, CIS3, MET6, SUC2, TDH2, and YLR049C (more than 1.5-fold) (ter Linde et al., 1999; *Saccharomyces Genome* database — SGD web site). Among these genes, MNN1, NCP1, ATM1, CIS3, MET6, TDH2, and YLR049C have validated clusters of the HRE motif (marked with an asterisk in Table 2).

The LORE element has been identified and characterized within the OLE1 promoter region, a gene up-regulated when yeasts are submitted to anaerobic conditions or treated with transition metals and iron chelators (Vasconcelles et al., 2001). Jiang et al. (2001) have demonstrated that Mga2p is a component of the LORE-binding complex using EMSA. Because it is unknown whether Mga2p is a classical transcriptional activator, these authors suggest that Mga2p could bind to LORE either directly or indirectly through an interaction with other proteins. Alternatively, Mga2p may bind to another as yet unidentified LORE-binding factor and form the LORE-binding complex which is normally observed (Jiang et al., 2001).

We searched for putative LORE elements in a similar way as for HREs in the yeast genome (upstream regulatory regions) and found 26 positive genes, all of them with a single motif (data not shown). In addition, only four of them are genes up-regulated anaerobically: OLE1 ($\Delta 9$ fatty acid desaturase), YFL052W (a putative zinc cluster protein that contains a DNA binding domain), BUL2 (a component of the Rsp5p E3-ubiquitin ligase complex) and GAT2 (a protein containing GATA-family zinc finger motifs). The later three genes have not been previously described in the literature as having a LORE motif. According to ter Linde et al. (1999), about 642 yeast genes are induced under anaerobic conditions and our results show the presence of the LORE motif in only four of them (cited above). These results indicate that additional, yet undescribed, DNA-binding elements responsive to low oxygen concentrations may exist in yeast.

Recently Braliou et al (2006) have co-expressed both subunits of HIF-1 (HIF-1 α and ARNT) in the yeast *S. cerevisiae*.

Using a plasmid containing a reporter gene controlled by an HRE element, the authors showed that human HIF-1 α and ARNT co-expressed in the yeast *S. cerevisiae* built up a functional transcription factor. Their results demonstrate that the yeast system contains the minimal components required for the human transcriptional response to hypoxia. Taken together, the evidence presented supports the hypothesis that critical aspects of the oxygen-sensing mechanism are highly conserved among all eukaryotes and probably an HIF-1-like response pathway is present in this organism.

In conclusion, we have described yeast genes that have putative HREs in their promoter sequence. Based on the results presented we speculate that a protein functionally homologous to HIF-1 may recognize the putative HREs found in *S. cerevisiae* genes and induce their transcription when yeast cells experience low levels of oxygen. Despite the fact that the oxygen levels that trigger a cellular response are different between yeast and mammals, a major area of investigation refers to how these pathways in both organisms sense changes in oxygen tension and how the signal is transduced to activate transcription factors. *S. cerevisiae* has been widely studied as a model system to better understand the role of oxygen depletion in the transcriptional response of hypoxic genes, since it is an organism capable of adapting to low levels of oxygen through the fermentation process. The evolutionary conservation of the response to oxygen levels from yeast to multicellular eukaryotes means that yeast can serve as a suitable model system for the characterization of the stress response in more complex organisms.

Acknowledgements

Túlio César Ferreira was supported by CAPES (Brazilian Foundation for the Coordination of Higher-Education and Graduate Training). We are deeply indebted to Hugo Costa Paes for revising the English.

Web sites cited

Saccharomyces Genome Database. <http://www.yeastgenome.org/>.
TRANSFAC, <http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html#transfac>.
Yeast-tools Belgian site, <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>.

References

- Aerts, S., Thijs, G., Coessens, B., Staes, M., Moreau, Y., Moor, B.D., 2003. Toucan: deciphering the *cis*-regulatory logic of coregulated genes. *Nucleic Acids Res.* 31 (6), 1753–1764.
- Alimardani, P., Régnacq, M., Moreau-Vauzelle, C., Ferreira, T., Rossignol, T., Blondin, B., Berergès, T., 2004. SUT1-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose synergistic action is sufficient for this process. *Biochem. J.* 381, 195–202.
- Amillet, J.-M., Buisson, N., Labbe-Bois, R., 1996. Characterization of an upstream activation sequence and two Rox-1p-responsive sites controlling the induction of the yeast HEM13 gene by oxygen and heme deficiency. *J. Biol. Chem.* 271, 24425–24432.
- Bailey, T., Elkan, C., 1995. Unsupervised learning of multiple motifs in biopolymers using expectation maximization. *Machine Learning* 21, 51–80.
- Bailey, T.L., Noble, W.S., 2003. Searching for statistically significant regulatory modules. *Bioinformatics (Suppl 2)*, II16–II25.
- Brahimi-Horn, C., Mazure, N., Pouyssegur, J., 2005. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell. Signal.* 17, 1–9.
- Braliou, G.G., Venieris, E., Kalousi, A., Simos, G., 2006. Reconstitution of human hypoxia inducible factor HIF-1 in yeast: a simple in vivo system to identify and characterize HIF-1alpha effectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 1289–1296.
- Burke, P.V., Raitt, D.C., Allen, L.A., Kellogg, E.A., Poyton, R.O., 1997. Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase genes in yeast. *J. Biol. Chem.* 272, 14705–14712.
- Chilov, D., Camenisch, G., Kvietikova, I., Ziegler, U., Gassmann, M., Wenger, R.H., 1999. Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 α . *J. Cell Sci.* 112, 1203–1212.
- Elbert, B.L., Bunn, H.F., 1998. Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4089–4096.
- Ebert, B.L., Firth, J.D., Ratcliffe, P.J., 1995. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct *cis*-acting sequences. *J. Biol. Chem.* 270, 29083–29089.
- Elkon, R., Linhart, C., Sharan, R., Shamir, R., Shiloh, Y., 2003. Genome-wide *in silico* identification of transcriptional regulators controlling the cell cycle in human cells. *Genome Res.* 13, 773–780.
- Emerling, B.M., Chandel, N.S., 2005. Oxygen sensing: getting pumped by sterols. *Sci. STKE* 289, pe30.
- Fandrey, J., Gorr, T.A., Gassmann, M., 2006. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc. Res.* 71, 642–651.
- Gassmann, M., Kvietikova, I., Rolfs, A., Wenger, R.H., 1997. Oxygen- and dioxin-regulated gene expression in mouse hepatoma cells. *Kidney Int.* 51, 567–574.
- Goffeau, A., Barrel, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274, 563–567.
- Gralla, E.B., Valentine, J.S., 1991. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutant. *Res. J. Bacteriol.* 173, 5918–5920.
- Graven, K.K., Troxler, R.F., Kornfeld, H., Panchenko, M.V., Farber, H.W., 1994. Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 269, 24446–24453.
- Graven, K.K., Yu, Q., Pan, D., Roncarati, J.S., Farber, H.W., 1999. Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1447, 208–218.
- Güldener, U., Münsterkötter, M., Kastenmüller, G., Strack, N., van Helden, J., Lemer, C., Richelles, J., Wodak, S.J., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J.E., Michael, H., Kaps, A., Talla, E., Dujon, B., André, B., Souciet, J.L., De Montigny, J., Bon, E., Gaillardin, C., Mewes, H.W., 2005. CYGD: the Comprehensive Yeast Genome Database. *Nucleic Acids Res.* 33, D364–D368.
- Helden, J.V., André, B., Collado-Vides, J., 2000. Yeast functional analysis report. A web site for the computational analysis of yeast regulatory sequences. *Yeast* 16, 177–187.
- Hertzberg, L., 2003. Probabilistic motif searching. Thesis for the M.S.c. Degree. Weizmann Institute of Science. Israel.
- Hertzberg, L., Zuk, O., Getz, G., Domany, E., 2005. Finding motifs in promoter regions. *J. Comput. Biol.* 12, 314–330.
- Holland, M.J., Holland, J.P., Thill, G.P., Jackson, K.A., 1981. The primary structures of two yeast enolase genes. Homology between the 5' noncoding flanking regions of yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J. Biol. Chem.* 256, 1385–1395.
- Holland, J.P., Labieniec, L., Swimmer, C., Holland, M.J., 1983. Homologous nucleotide sequences at the 5' termini of messenger RNAs synthesized from the yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families. The primary structure of a third yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* 258, 5291–5299.
- Hughes, J.D., Estep, P.W., Tavazoie, S., Church, G.M., 2000. Computational identification of *cis*-regulatory elements associated with groups of

- functionally related genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 296, 1205–1214.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J., Kim, K.W., 2002. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111, 709–720.
- Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C., Marti, H.H., 1996. Hypoxia-inducible factor-1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol.* 271, C1172–C1180.
- Jiang, Y., M.J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C.E., Goldberg, M.A., 2001. *MGA2* Is Involved in the Low-Oxygen Response Element-Dependent Hypoxic Induction of Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6161–6169.
- Kaiser, C., Michaelis, S., Mitchell, A., 1994. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 207–210.
- Kwast, K.E., Burke, P.V., Staahl, B.T., Poyton, R.O., 1999. Oxygen sensing in yeast: evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5447–5451.
- Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., Goldberg, M.A., 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 270, 13333–13340.
- Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., Kourembanas, S., 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* 77, 638–643.
- Lu, S., Gu, X., Hoestje, S., Epner, D.E., 2002. Identification of an additional hypoxia responsive element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Biochim. Biophys. Acta* 1574, 152–156.
- Matys, V., Fricke, E., Geffers, R., Gößling, E., Haubrock, M., Hehl, R., Hornischer, K., Karas, D., Kel, A.E., Kel-Margoulis, O.V., Kloos, D.-U., Land, S., Lewicki-Potapov, B., Michael, H., Münch, R., Reuter, I., Rotert, S., Saxel, H., Scheer, M., Thiele, S., Wingender, E., 2003. TRANSFAC1: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res.* 31, 374–378.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., Ratcliffe, P.J., 1999. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factor for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275.
- Meyer-Siegler, K., Mauro, D.J., Seal, G., Wurzer, J., deRiel, J.K., Sirover, M.A., 1991. A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 8460–8464.
- Poveda, A., Pamblanco, M., Tafrov, S., Tordera, V., Sternglanz, R., Sendra, R., 2004. Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 279, 16033–16043.
- Poyton, R.O., Burke, P.V., 1992. Oxygen regulated transcription of cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase genes in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1101, 252–256.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T., 1995. MatInd and MatInspector: new, fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23, 4878–4884.
- Rees, B.B., Bowman, J.A., Schulte, P.M., 2001. Structure and sequence conservation of a putative hypoxia response element in the lactate dehydrogenase-B gene of *Fundulus*. *Biol. Bull.* 200, 247–251.
- Sabová, L., Zeman, I., Supek, F., Kolarov, J., 1993. Transcriptional control of *AAC* gene encoding mitochondrial ADP/ATP translocator in *Saccharomyces cerevisiae* by oxygen, heme and ROX1 factor. *Eur. J. Biochem.* 213, 547–553.
- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.-M., Wang, G.L., 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269, 23757–23763.
- Sirover, M.A., 1999. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1432, 159–184.
- Soitamo, A.J., Rabergh, C.M., Gassmann, M., Sistonen, L., Nikinmaa, M., 2001. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. *J. Biol. Chem.* 276, 19699–19705.
- ter Linde, J.J.M.T., Liang, H., Davis, R.W., Steensma, H.Y., Dijken, J.P.V., Pronk, J.T., 1999. Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181, 7409–7413.
- Thijs, G., Marchel, K., Lescot, M., Rombauts, S., Moor, B.D., Rouze, P., Moreau, Y., 2002. A Gibbs sampling method to detect overrepresented motifs in the upstream regions of coexpressed genes. *J. Comp. Biol.* 9, 447–464.
- Vasconcelles, M.J., Jiang, Y., McDaid, K., Gilooly, L., Wretzel, S., Porter, D.L., Martin, C.E., Goldberg, M.A., 2001. Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes. Implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 276, 14374–14384.
- Wang, G.L., Semenza, G.L., 1993. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4304–4308.
- Wang, G.L., Jiang, B.-H., Rue, E.A., Semenza, G.L., 1995. Hypoxia-inducible factor is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5510–5514.
- Wenger, R.H., Gassmann, M., 1997. Oxygen(es) and hypoxia-inducible factor-1. *Biol. Chem.* 378, 609–616.
- Wenger, R.H., Stiehl, D.P., Camenisch, G., 2005. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci. STKE* 2005, re12.
- Zitomer, R., Lowry, C.V., 1992. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 56, 1–11.