

Efecte de la glucosa en un model d'isquèmia *in vitro*: modulació del factor induït per hipòxia i de la mort cel·lular programada.

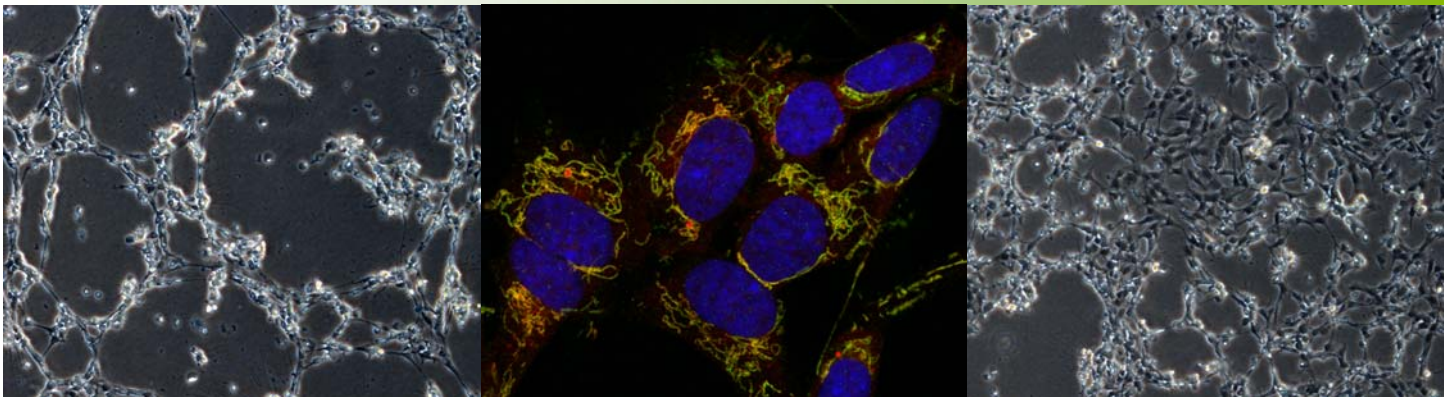
Anna Serra Pérez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Efecte de la glucosa en un model
d'isquèmia *in vitro*: modulació del factor
induit per hipòxia i de la mort cel·lular
programada



Anna Serra Pérez
Tesi doctoral

2010
2010

Primer de tot cal dir que uns agraïments no són gens fàcils de plasmar en paper, és impossible de resumir. Una tesi són mots anys i cadascuna de les persones que m'he anat trobant pel camí m'ha ensenyat quelcom, en qualsevol sentit. Cadascun de vosaltres m'ha ajudat a tirar-la endavant i que arribi a ser com és, així que moltíssimes gràcies a tots. De fet, aquest apartat es podria resumir com, a tots aquells que heu compartit aquest temps amb mi, sigui en l'ambient que sigui i amb la relació que sigui, gràcies per aquest temps a la meua vida, gràcies per aquest espai al meu món, el món de la tesi, he après moltíssim. Gràcies perquè tots en la vostra mesura heu col·laborat en aconseguir fer aquesta tesi, i en fer la persona que sóc avui. Sou molta gent, i no em voldria oblidar ningú, així que doneu-vos tots per inclosos en la felicitació, és una tesi en part de tots, tot hi heu col·laborat, gràcies!!

Gràcies primer de tot als directors. Merci a en Tomàs, pel seu suport i per la seva confiança, per descriure'm amb ulls il·luminats la degradació de HIF; com quelcom tant petit pot ser tant complex i elaborat. Gràcies a l'Anna per la seva proximitat, i per transmetre'm l'optimisme pels resultats. Els dos complementeu la visió d'una mateixa cosa, m'heu demostrat que tot es pot veure desde moltes perspectives.

També vull agrair als que han compartit amb mi aquest temps, el dia a dia. Moltíssimes gràcies a tot el 610, a les mil persones que el formen actualment i a les persones que el formaven als meus inicis i ja han marxat; per mi no deixen de ser-ne una part. El 610 té més densitat que el Japó, però encara ens en sortim prou bé... Gràcies per construir l'ambient del *labo*, gràcies pels somriures en moments caòtics i per aquest temps de convivència, gràcies per conèixer-us; els de sempre, i els fitxatges més o menys recents: Rous, Miri, Abra, Santi, Fèlix, Valèrie, les "nenes maques", Ester i Esther, Noe, Fer, Leo, Paqui, Jesús, Carles, Lupe, Isa, Xevi, Unai, Glòria, Bea, Miguel, Eva, Luca, Angèlica, Cédric; aquells que han vingut per una estada però han marcat, Alba, Elvira, Nacho el Amigo invisible, ... I a tots els que formen el grup d'isquèmia. Merci!

Gràcies pels congressos, amb la convivència que això implica, gràcies per la hospitalitat, les birretes i els futbolins, per tenir-me constantment al dia amb els resultats del futbol entre incubació i incubació, el bon ambient, les bones preguntes als seminaris, gràcies sobretot pels riures i l'ambient desenfadat i divertit dels inicis, per respondre a preguntes en moments poc oportuns, per les xerrades a cultius, per cedir campanes i centrífugues; gràcies pel companyerisme. Un laboratori i una tesi són moltes coses, és compartir l'espai, i el temps, gràcies per això i per fer-ho amb un somriure. Són els cubells de pots nets a sobre la *poyata*, és trobar les pipetes dels mil colors possibles però

no trobar mai els teus, perdre el fil del pou que tocava emplenar per despistar-me parlant amb la Verdi companya de *pojata*, bellíssima persona i un model a seguir, que m'ha ensenyat què és un *kit* i moltes altres coses, sentir el fil musical del que canta des de l'altra banda del laboratori, el riure compulsiu de les 7 de la tarda, els *breaks* pautats i tant desitjats, el repte dels dilluns, que se m'ha acabat encomanant (Rous, merci per l'escalivada, les barraques, St. Llorenç i per compartir aquests anys), la gran combinació (i peculiar) de l'Abra i en Santi, les parades pel passadís camí de cultius, i les mateixes parades de baixada perquè m'havien oblidat mil coses, les converses a les escales amb la Míriam, que mai deixa de sorprendre'm, Isa, Xevi, gironins! i Lupe, gràcies pels tapers i les *nespressos* de mitja tarda, les terrassetes i els trens i per fer un ambient de confiança i tant distès, per una visió pràctica de les coses que a vegades tant em cal, Noe, gràcies per escoltar, moltíssimes gràcies Carles, no tinc paraules! no em calen; les converses divertides al despatxet de'n Fer i l'Esther (gràcies per respondre les mil i una preguntes!..i les que queden!), per l'alegria, el bon humor, i les bromes, gràcies Paqui, el guapa que anima a tothom (en qualsevol idioma...). Gràcies per les sessions d'entrepans amb els clínics, que suposen el repte continu i motivador d'aproximar els dos móns. Cal dir que aquesta tesi ha estat possible gràcies a la paciència de la Núria, la Montse i l'Amanda. Merci!

Gràcies a tot l'IIBB, Gràcies a tots els que m'heu ajudat sigui amb respostes o amb fets. Merci!. Gràcies a l'ambient del passadís farmaco durant aquests anys, tant als dels laboratoris com als dels despatxos, gràcies, tots heu col·laborat a crear-lo. Gràcies a uns veïns reis de l'ordre al laboratori, Aroa, Pili, Núria ets un sol! Marco, a qui no aconseguies animar?. I als altres veïns, la Loli, única, Bego gràcies em quedo amb el *sigue así!*, Jari!, fent la millor cara el pitjor del dies, i seguint treballant amb energia, gràcies pel *hola Anna* somrient!, la Laura, gràcies per tant, buf! passar a dir adéu i que la xerrera s'allargui! eres un *ejemplazo!* Sigue alegre, y pràctica, que yo te seguiré preguntando. Gràcies per les activitats *extraescolars*, neuroquímica, ningú organitza com vosaltres! les cases rurals mar-i-muntanya, l'aire pur, els calçots i les butifarrades, les danses i l'acordeó, amb música particular, els billars i els futbolins, per donar-me l'honor de ser ministra,... Als acabats de descobrir i als de sempre, Sebastians, Pacos, Lupes, i 7es, merci!. A la Mercè una bona amiga, Mireia, gràcies per la confiança i mostrar sempre interès, Eli, gràcies per les recomacions virtuals a última hora, Xavi pels sopars tremendament divertits cara a cara, Noe, per les converses de tota mena, Ferni, Iza, bones amigues, gràcies per l'ajuda en molts sentits i per començar amb mi un nou

any. Gràcies a tothom que ha preguntat com va, com ho portes,...i “de què va el teu pòster?”. Gràcies per l’interès.

Gràcies a tothom del grup del laboratori de Bilbao, perquè em va ensenyar moltíssim de com treballar en un altre lloc, vaig aprendre molt. *Eskerrik asko*, chicas! Gracias Eze, por todo, y Davitxu, que bien me vinisteis y cuánto aprendí! A la Txell, perquè segones parts sí que poden ser bones.

Gràcies a tots aquells que s’han atrevit a fer la pregunta de “i la tesis de què va?”. Merci gironins, Jordi, Maria, gràcies, Laia, a tots per contribuir en part a aquesta tesi. Gràcies als amics de la uni, als swingers, Txell, Cris, Laura, grans descobriments! i als balboeros, em feu sentir com a casa.

Gràcies a la família empordanesa, que pregunta constantment com va tot, i què es això de la tesis, al meu avi, un pou de coneixement insaciable que té una curiositat que l’alimenta de vida.

I finalment com no, moltíssimes gràcies als meus pares, pel suport constant, per tot. He arribat aquí i sóc com sóc gràcies a ells. Gràcies, sou únics i haig de que els millors!

Em quedo sense espai per agrair-ho a tothom que ho mereix, així que,
Moltíssimes gràcies a tots!!

ÍNDEX

1. ABREVIATURES.....	3
2. INTRODUCCIÓ.....	5
2.1. La isquèmia cerebral	5
2.2. Estudi de la isquèmia <i>in vitro</i> : model de privació d'oxigen i glucosa	10
2.3. La línia cel·lular derivada de neuroblastoma SH-SY5Y	13
2.3.1. Diferenciació.	14
2.3.2. Aplicacions en l'estudi d'hipòxia-isquèmia.	16
2.4. Mort cel·lular en la isquèmia	18
2.4.1. Mort necròtica	18
2.4.2. Mort apoptòtica	19
2.4.2.1. Apoptosis dependent de caspases	21
2.4.2.2. Apoptosis independent de caspases	26
2.5. Metabolisme cel·lular de la glucosa	28
2.6. Resposta a hipòxia: paper del factor induïble per hipòxia (HIF)	31
2.6.1. Descripció i regulació del Factor de transcripció HIF	31
2.6.2. Sistema principal de degradació de la subunitat α dependent d'oxigen:PHDs-VHL-proteasoma	35
2.6.2.1. PHDs: hidroxilació en Prolina	36
2.6.2.2. Ubiquitinització i degradació	40
2.6.3. Mecanisme d'acció de HIF	44
2.6.4. Resposta d'adaptació a hipòxia	46
3. OBJECTIUS.....	51
4. MATERIALS I MÈTODES.....	53
4.1. Cultius cel·lulars	53
4.1.1. Línia cel·lular SH-SY5Y	53
4.1.2. Línia cel·lular RCC4	54
4.1.3. Cultius de neurones	54
4.2. Isquèmia <i>in vitro</i> : Privació d'Oxigen i Glucosa (OGD)	55
4.2.1. OGD en caixa hermètica i flux de gasos	55
4.2.1.1. OGD en SH-SY5Y	55
4.2.1.2. OGD en RCC4	58
4.2.2. OGD en incubador d'hipòxia	59

4.2.2.1.	Cultius primaris de neurones	59
4.2.2.2.	OGD en SH-SY5Y percentatges d'oxigen majors	60
4.3.	Extracció de proteïnes	61
4.3.1.	Fraccionament subcel·lular	62
4.3.2.	Extractes cel·lulars totals	64
4.4.	Western blot	65
4.4.1.	Quantificació de proteïna	65
-	Assaig Bradford	66
-	Assaig àcid Bicinconinic (BCA)	65
4.4.2.	Western Blot	66
4.5.	Estudi de la mort cel·lular	71
4.5.1.	Contatge cel·lular de la tinció amb Iodur de Propidi (IP)	71
4.5.2.	Anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux	72
4.5.3.	Mesura de l'activitat caspasa 3	73
4.5.4.	Immunocitoquímica de caspasa 3 activada	74
4.6.	Quantificació dels nivells intracelulars d'ATP	75
4.7.	Quantificació de proteïnes per ELISA	77
4.8.	Assaig d'interacció proteïna-DNA per ELISA	78
4.9.	Estudi de l'activitat transcripcional: assaig luciferasa	80
4.10.	Estudi de l'activitat del proteasoma	82
4.11.	Determinació dels metabòlits del TCA	84
4.12.	Determinació de la condició d'hipòxia per detecció d'adductes proteïna-Pimonidazol	86
4.13.	Anàlisi estadístic	87
5.	RESULTATS.....	89
1.	Article 1	91
2.	Article 2	107
6.	DISCUSSIÓ.....	131
7.	CONCLUSIONS.....	137
8.	BIBLIOGRAFIA.....	139

ABREVIATURES

1. ABBREVIATURES

AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
ADP	<i>Adenosine Diphosphate</i>
Bcl2	<i>B-cell Lymphoma Protein2</i>
BH3-only	<i>Bcl2 Homology Domain 3</i>
CBP	<i>Cyclic-AMP-response-element-Binding Protein(CREB) binding protein</i>
FADH	<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>
Fe	<i>Ferro</i>
Glut1	<i>Glucose transporter 1</i>
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i>
HIF1	<i>Hypoxia Inducible Factor 1</i>
HIF2	<i>Hypoxia Inducible Factor 2</i>
HK	<i>Hexokinase</i>
H ₂ O ₂	<i>Aigua oxigenada</i>
KO	<i>Knock Out</i>
KG	<i>Alpha Ketoglutaric acid</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NB	<i>Neuroblastoma</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
NMDA	<i>N-metil-D- aspartate</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
OD	<i>Oxygen Deprivation</i>
ODDD	<i>Oxygen-Dependent Degradation Domain</i>
OGD	<i>Oxygen and Glucose Deprivation</i>
OxPHOS	<i>Oxidative Phosphorylation</i>
PHD	<i>Prolyl hydroxylases</i>
RA	<i>Retinoic acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
STS	<i>Staurosporine</i>

SDH	<i>Succinate Deshydrogenase</i>
Ub	<i>Ubiquitin</i>
UPS	<i>Ubiquitin Proteasome system</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
a.a.	<i>Amino acid</i>
t.a.	Temperatura ambient
o.n	<i>Overnight</i>

INTRODUCCIÓ

2. INTRODUCCIÓ

2.1. La isquèmia cerebral:

L'accident cerebrovascular o ictus (en anglès *stroke*) és la tercera causa de mort als països industrialitzats (després de les malalties cardíaques i el càncer), i és la principal causa de discapacitat.

La malaltia cerebrovascular isquèmica implica la reducció del flux sanguini cerebral per sota del nivell crític, ja sigui a nivell global (isquèmia global) o en un territori arterial restringit (isquèmia focal), causada per l'obstrucció del flux sanguini (ictus isquèmic) o ruptura d'un vas sanguini (ictus hemorràgic). Com a conseqüència l'aport d'oxigen i glucosa a nivell cel·lular es restringeix i es genera un gradient de dany, amb un nucli isquèmic principalment de mort cel·lular necròtica (el "core" de l'infart) i una zona més perifèrica ("penombra" isquèmica) on existeix un aport sanguini mínim per circulació col·lateral. La zona de penombra és la potencialment salvable i cap a on s'enfoca la recerca terapèutica per a l'ictus (Sanchez-Chavez, 1999)

La funcionalitat cerebral és totalment dependent de glucosa i d'oxigen. Després de l'ictus s'origina una cascada citotòxica que provoca el dany del teixit. L'estrès oxidatiu, la difunció mitocondrial i la caiguda energètica són els principals aconeteixements (de Groot and Rauen, 2007; Mattson et al., 2000):

- El metabolisme oxidatiu resulta compromès i es du a terme un **metabolisme anaeròbic**, s'incrementa la taxa glicolítica que comporta una elevada producció d'àcid làctic i una acidificació del pH, que danya el teixit i la funció cerebral (Symon, 1993).
- Com a conseqüència de la fallada del metabolisme i l'esgotament de les reserves energètiques, cauen ràpidament i dràsticament els nivells **d'ATP intracel·lular** després de l'isquèmia com a conseqüència de la parada de la fosforil·lació oxidativa.
- Això condueix a la fallada de les **bombes iòniques** dependents d'ATP (no poden treure sodi ni calci activament de dins la cèl·lula). No es pot mantenir el potencial de repòs de la membrana plasmàtica, provocant la sortida de potasi a l'espai extracel·lular i l'entrada de calci i sodi dins la cèl·lula, juntament amb aigua per pressió osmòtica (Siesjo, 1990). Això comporta la despolarització de

la membrana cel·lular, que promou l'activació dels receptors de glutamat, i s'alliberen glutamat i altres aminoàcids excitatoris.

- L'acúmul de glutamat i l'activació dels receptors de NMDA és el que es coneix com **excitotoxicitat**, que condueix a l'**increment de Calci** intracel·lular, tant per l'entrada des de fóra de la cèl·lula com per l'alliberació desde compartiments cel·lulars com la mitocondria. Això condueix a l'activació de molts enzims depenents de calci que destrueixen el material cel·lular (hidrolases, quinases, fosfatases, proteases (calpaïnes entre d'altres), fosfolipases, endonucleases, sintasa d'òxid nítric).
- La disfunció mitocondrial indueix diferències en la polarització de la membrana mitocondrial, i la seva **permeabilització** permet l'alliberació de proteïnes proapoptòtiques com citocrom c o AIF. La disfunció mitocondrial conseqüència de la fallada energètica i de l'excés de calci, fa que el mitocondri sigui una font important de la producció de radicals lliures: s'indueix elevat **estrés oxidatiu**. També es dona peroxidació lipídica en neurones per estrés oxidatiu. (Mattson et al., 2000). En models in vivo d'isquèmia, tant focal com global, es detecta elevat dany oxidatiu en proteïnes, lípids i DNA en la població neuronal, més sensible.
- Inflamació: S'activen factors de transcripció com NFκB (*Nuclear Factor Kappa-B*) que condueix a l'expressió de citoquines proinflamatòries, que juntament amb els leucotriens activats per calci, indueixen la infiltració leucocitària. Les citoquines i l'òxid nítric principalment provenen de la microglia.

Posteriorment a l'episodi isquèmic el dany per reperfusió es conseqüència de l'estrés oxidatiu i la resposta inflamatòria, que implica molts tipus cel·lulars com macròfags, cèl·lules endotelials, neutròfils o limfòcits. Els leucòcits infiltrats augmenten la producció de radicals lliures i secreten mediadors inflamatoris que potencien la destrucció tissular. La microglia contribueix al dany tissular produint citoquines i radicals lliures. Cal pensar que les cèl·lules glials juguen un paper important donada la seva interacció amb les neurones, en modificar les condicions de sensibilitat d'aquestes a l'apoptosi. Per exemple els astròcits produeixen factors de creixement antiapoptòtics, mentre la microglia produeix substàncies neurotxiques, com óxid nítric i excitotoxines.

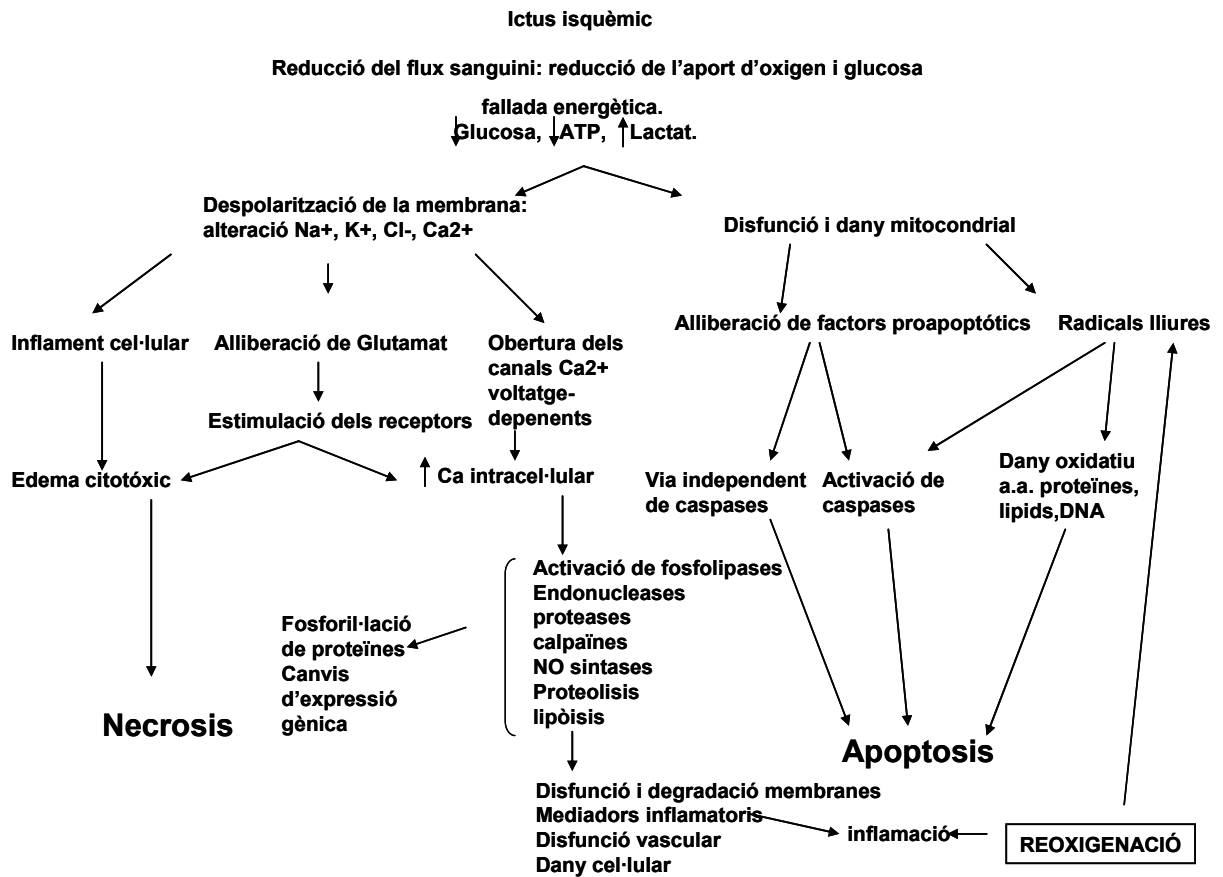


Fig 1. Esquema de la cascada isquèmica que activa la mort cel·lular, modificat de (Mattson et al., 2000).

Paper de la glucosa en la isquèmia

Diversos estudis avaluen el dany isquèmic en relació a concentracions elevades de glucosa. En els pacients d'ictus isquèmic la hiperglicèmia a l'inici de l'ictus empitjora el pronòstic. Pacients hiperglicèmics no diabètics presenten major nivell de discapacitat i s'incrementa per tres la mortalitat als trenta dies (Capes et al., 2001). El volum d'infart en pacients hiperglicèmics amb reperfusió és tres vegades major que els no hiperglicèmics. (Alvarez-Sabin et al., 2003)

Els nivells plasmàtics de glucosa són rellevants en models experimentals d'isquèmia focal cerebral amb reperfusió. En aquest sentit, s'ha relacionat l'efecte negatiu amb la producció i acumulació de lactat (Combs et al., 1990; Chopp et al., 1988; Ginsberg, 1990; Siesjo et al., 1990), que s'incrementa en la isquèmia amb hiperglicèmia (Folbergrova et al., 1992) però aquest no sembla induir dany sol (Lin et al., 1995). La hiperglicèmia acidifica el compartiment astrocític durant la isquèmia i indueix producció de ROS, modificant la morfologia mitocondrial (Yu et al., 2006b). La hiperglicèmia és

perjudicial per a l'ictus, exceptuant en el sistema nerviós imadur, on sembla que redueix el dany isquèmic, potser degut a que tot i la presència de glucosa no s'observa un increment en la utilització de glucosa ni en la producció de lactat (Hertz, 2008). L'increment del dany cerebral en la hiperglicèmia vist *in vivo* es reproduïx en experiments *in vitro* amb talls d'hipocamp: la glucosa *per se*, però no el lactat, en combinació amb acidosis metabòlica l'empitjora el dany per mecanismes independents de receptors glutamatèrgics (Cronberg et al., 2004). En experiments *in vitro*, nivells elevats de glucosa durant la hipòxia incrementen la mortalitat en cultius d'astròcits: la mortalitat en la reoxigenació és de 20% quan la hipòxia és en concentracions de glucosa 5mM i incrementa fins a ser de 50% en concentracions 27mM. (Orellana et al., 2010).

Existeixen moltes observacions de l'efecte negatiu de la glucosa (Martini and Kent, 2007) però el mecanisme d'acció no està resolt. La hiperglicèmia incrementa la resposta inflamatòria (infiltració de leucòcits, adhesió leucòcit-endoteli) en la isquèmia i reoxigenació (Lin et al., 2000) i això pot contribuir a empitjorar el dany isquèmic. L'alliberació de glucocorticoides induïda per la hiperglicèmia és perjudicial en un model d'isquèmia global en rates (Payne et al., 2003; Schurr, 2002; Schurr et al., 2001). La hiperglicèmia empitjora el dany isquèmic en models d'isquèmia *in vivo* en rates, incrementa els corticoesteroides en plasma, la infiltració de neutròfils i la O-glicosilació de proteïnes (Martin et al., 2006).

En models animals la hiperglicèmia després d'una isquèmia severa dificulta la reperfusió i incrementa el risc d'hemorràgies mentre després d'isquèmies més breus la reperfusió no s'altera però s'incrementa el dany per alteracions metabòliques (Martini and Kent, 2007). La hiperglicèmia altera la resposta vascular, modificant paràmetres bioquímics en les cèl·lules endotelials que repercuteixen en la correcta reperfusió. Les cèl·lules endotelials capten glucosa pel transportador de glucosa Glut1, que no és dependent d'insulina, de manera que la hiperglicèmia vascular condueix a la hiperglicèmia intracel·lular, desencadenant increment en la glicòlisis i en la producció de ROS pel mitocondri, que activa vies de regulació negativa dels propis enzims glicolítics per reduir la taxa glicolítica. Això incrementa la concentració de metabòlits, que llavors actuen sobre altres vies. Es redueix la via anabòlica de les pentoses fosfat, que aporta poder reductor NADPH, s'incrementa la O-glicosilació, s'activen vies quinasa, conduint en conjunt a la inhibició de la fibrinolisi, increment de l'estrés oxidatiu, de l'adhesió leucocitària, i de la inflamació. (Martini and Kent, 2007).

Tot i que els dos processos de mort necròtic i apoptòtic presenten morfologia i bioquímica diferents, s'ha demostrat la possibilitat de conversió d'un tipus de mort a l'altra (Ueda and Fujita, 2004). Sembla que la glucosa permet un canvi de la mort de necròtica a apoptòtica, potser incrementant els nivells d'ATP i permetent l'activació de caspases. La privació d'ATP induïx un canvi de mort d'apoptòtic a necròtic. La mort necròtica induïda per la falta de factors de creixement en cultius neuronals de baixa densitat esdevé apoptòtica si s'incrementen els nivells d'ATP mitjançant l'addició d'elevades concentracions de glucosa al medi (Fujita and Ueda, 2003a, b).

2.2. Estudi de la isquèmia in vitro: model de privació d'Oxigen i Glucosa.

Donada la complexitat de la isquèmia cerebral i de la cascada isquèmica, existeixen diferents aproximacions experimentals tant *in vivo* com *in vitro* per centrar l'estudi i mimetitzar una part d'aquesta resposta.

- *In vivo*:
 - Models animals d'isquèmia global: oclusió de les grans artèries que irriguen el cervell . S'interromp transitòriament tot l'aport sanguini al cervell
 - Models animals d'isquèmia focal: oclusió d'una artèria específica, la més usada és la oclusió de l'artèria cerebral mitja (en anglès, MCAO). Es redueix l'aport sanguini d'una zona delimitada de manera permanent o transitòria.
- *In vitro*: (ja sigui per talls de teixit o per cultius cel·lulars)
 - Privació d'oxigen i glucosa (OGD: *Oxygen and Glucose Deprivation*)
 - Model d'excitotoxicitat: ús d'agonistes dels receptors de NMDA (com NDMA o glutamat)
 - Isquèmia química (oxidatiu: óxid nítric (NO), Ferro (Fe^{2+}))

Model d'OGD

El model d'OGD és un model isquèmic centrat en la caiguda energètica i la fallada del metabolisme oxidatiu presents en la isquèmia. Es mimetitza la reducció de l'aport de nutrients i oxigen que succeeix en l'ictus mantenint les cèl·lules en un ambient hipòxic /anòxic i retirant la glucosa del medi. Existeixen limitacions respecte el model *in vivo*, per exemple, en cultiu les cèl·lules tenen espai per adaptar-se mentre en el teixit neuronal el dany cel·lular fa que les cèl·lules s'inflin i això augmenta la pressió intracraneal; es perd l'estructura i interacció sorgides de l'acoplament neurovascular; el consum energètic *in vivo* és major, mentre les neurones en cultiu consumeixen l'energia més lentament.

Existeix una gran varietat de possibilitats pel model d'OGD. Els paràmetres s'estableixen depenent de la finalitat de l'estudi:

- tipus cel·lular, en relació a l'àmbit d'estudi de la hipòxia com és isquèmia cerebral, infart cardiovascular o hipòxia en tumors. En el cas de la isquèmia cerebral existeixen estudis realitzats en cultius primaris de neurones (Iijima,

2006), astròcits (Orellana et al., 2010), cultius mixtes, i també en línies cel·lulars (Abu-Raya et al., 1999; Tabakman et al., 2005) i en seccions de teixit (Chen et al., 1997).

- Depenent del tipus cel·lular usat i de la resposta que es vol estudiar s'estableix la intensitat i durada de l'estímul hipòxic. Per exemple, hipòxies cròniques s'enfoquen a l'estudi d'adaptació metabòlica (Ginouves et al., 2008)). En el cas dels astròcits, per exemple, calen estímuls més llargs per induir resposta (3-6h) que en el cas de les neurones, ja que presenten major resistència a la OGD donada la seva capacitat de canvi d'un metabolisme aeròbic a aneròbic.(Orellana et al., 2010)
- El rang d'aport de nutrients també és rellevant: la privació pot ser exclusivament d'oxigen, en presència de glucosa (*oxygen deprivation: OD*)(Fordel et al., 2007) (Jogi et al., 2002), o conjunta de glucosa i oxigen, aquesta alhora pot ser en presència de medi de cultiu sense glucosa, sense sèrum o en presència de tampons (Ohno et al., 2007).

La possibilitat de variar tots els paràmetres fa que el model d'OGD sigui molt útil, i aplicable en estudis molt diversos.

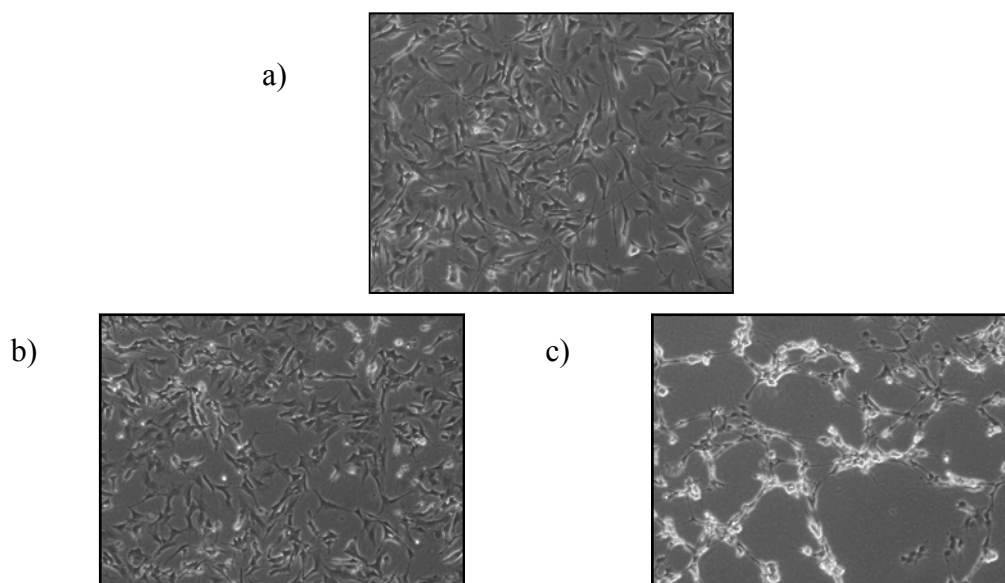


Fig2. Línia cel·lular SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humà, imatges de contrast de fase, 15h de : a) normòxia ; b) OD; c) OGD.

La OGD en cultius neuronals indueix la disminució dels nivells d'ATP intracel·lular i l'increment del calci citosòlic; en la reoxigenació posterior s'incrementen els nivells

energètics progressivament (Iijima, 2006; Kusumoto et al., 1996; Nath et al., 1998). En sotmetre les cèl·lules a OGD s'indueix mort cel·lular en acabar el període hipòxic i en la reoxigenació posterior. La mort induïda depèn de la durada i la intensitat de l'estímul, implicant tant vies apoptòtiques com necròtiques. Períodes anòxics de 15 min. seguits de 24h de reoxigenació redueixen la viabilitat un 20%, però quan els períodes anòxics són més llargs (75min) es redueix la viabilitat un 70% (Malagelada et al., 2005). Els cultius corticals de rata exposats a OGD indueixen tant mort apoptòtica depenent de caspases (caspasa3) com necròtica, amb una contribució a la mort global variable depenent de la durada de la hipòxia. La inhibició de les caspases protegeix de la mort (Le et al., 2002). En períodes més llargs d'OGD, s'incrementa la proporció de mort necròtica.

La OGD no representa tots els fenòmens de l'episodi isquèmic però és un bon model per estudiar el comportament del mitocondri en isquèmia, i és un model molt usat en l'estudi del potencial de membrana mitocondrial (Iijima et al., 2003). Globalment, els models d'OGD centren el seu estudi en el paper del mitocondri, el seu potencial de membrana, la baixada d'ATP intracel·lular i la mort tant necròtica com apoptòtica.

2.3. La línia cel·lular derivada de neuroblastoma humà SH-SY5Y

En aquest treball s'ha utilitzat la línia cel·lular derivada de neuroblastoma humà SH-SY5Y, ja que per a estudis moleculars resulta més útil treballar amb una línia cel·lular i alhora que aquestes cèl·lules són molt utilitzades en l'àrea de neurociències donats els molts protocols coneguts per a la seva diferenciació. En diferents estudis s'indueix la diferenciació en les SH-SY5Y, com són alguns d'isquèmia *in vitro* (Jogi et al., 2002; Ohno et al., 2007), de neurotoxicitat (Kim et al., 2005), i d'activació de vies de mort cel·lular programada (Axelsson et al., 2006; Shen et al., 2007; Um and Lodish, 2006). Existeixen molts estudis en l'àmbit de patogènesis neurodegeneratives on es treballa amb aquestes cèl·lules, com és el cas de la malaltia de Parkinson, ja que responen activant mort cel·lular (Hu et al., 2005). Estudis amb SH-SY5Y indiquen que capten DA (Takahashi et al., 1994) activen caspases (3, 9 i 6), i inhibició d'aquestes millora la viabilitat (Lee et al., 2007; von Coelln et al., 2001). Tot i aquestes característiques i donada la seva limitació quant a línia cel·lular, no es descarta que estudis posteriors en cultius primaris de neurones siguin necessaris.

Neuroblastoma (NB) és el tumor sòlid més freqüent durant la infància, essent el 8-10% del global de tumors infantils (Reynolds et al., 2003). S'origina per la diferenciació deficient de les cèl·lules de la cresta neural, que tendeixen a migrar i envair durant el desenvolupament. Donat el seu origen multipotencial, en neuroblastoma humà s'han descrit diferents tipus cel·lulars: el tipus S (precursors de Schwann) les menys tumorigèniques, el tipus N (precursors neuroblàstic/neuroendocrí), i el tipus I (intermig entre N i S) les més tumorigèniques (Ross et al., 2003). Aquesta heterogenicitat dificulta i empitjora el pronòstic (Joshi et al., 2007). Es coneixen diferents alteracions en NB, com pèrdua de l'heterozigosis per a seqüències del braç curt de diferents cromosomes (Brodeur et al., 1981; Fong et al., 1989; Gilbert et al., 1984). Existeixen moltes línies cel·lulars derivades de neuroblastoma usades en la investigació, es poden agrupar per la presència o no d'amplificació del gen N-myc, o per resistència a retinoides, que s'associa a agressivitat del tumor i pitjor pronòstic. (Reynolds and Lemons, 2001; Reynolds et al., 2003).

La línia cel·lular usada en aquest treball, SH-SY5Y, és una sub-línia obtinguda a partir de la línia cel·lular SK-N-SH. Són cèl·lules del tipus N, neuroblasts simpàtics immadurs sovint amb trets de la cresta neural (Gestblom et al., 1999). Contenen enzims i receptors presents en neuroblasts en desenvolupament (tirosina hidroxilasa, dopamina

hidroxilasa, transportador de la recaptació de noradrenalina, receptor de poca afinitat del factor de creixement *Nerve Growth Factor* (NGF)), proteïnes del neurofilament i “granins” vesiculars (Ross et al., 2003). Les cèl·lules SHSY5Y són catecolaminèrgiques, però no presenten nivells molt elevats de Noradrenalina (NA) i Dopamina (DA).

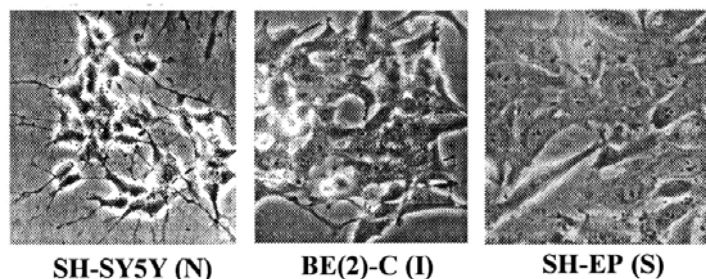


Fig 3. Imatges de línies cel·lulars derivades de neuroblastoma: tipus N (SH-SY5Y), tipus I (BE(2)-C) i tipus S (SH-EP) respectivament; obtinguda de (Ross et al., 2003).

2.3.1. Diferenciació:

Les línies cel·lulars derivades de neuroblastoma tenen la capacitat de diferenciar-se adquirint alguns trets neuronals en condicions idònies de creixement. Es coneixen diferents estímuls que indueixen la diferenciació, per diferents vies que resulten en fenotips diferents (Pahlman et al., 1995).

La línia cel·lular SH-SY5Y pot ser diferenciada per diferents mètodes. Un d'ells és el tractament amb ésters de forbol que disminueixen la proliferació, indueixen canvis morfològics com increment de les projeccions, grànuls secretors, i indueixen de canvis bioquímics com increment de l'enolasa específica de neurones i de la concentració de noadrenalina i adrenalina (Pahlman et al., 1990; Pahlman et al., 1981). La diferenciació amb ésters de forbol és incrementada per la presència de factors de creixement, però aquests per si sols també indueixen diferenciació (Kurihara et al., 2000) tot i que no aturen la proliferació (Lavenius et al., 1994). Fins i tot l'estaurosporina (STS) (inhibidor de les quinases alfa, beta i zeta) indueix un fenotip madur neuronal noradrenèrgic en cèl·lules SHSY5Y. Resulta en la inducció del creixement processos semblants a neurites, parada de la síntesis de DNA, inducció de la proteïna associada al creixement, del neuropeptid Y, de tirosina hidroxilasa i incrementa els nivells de noradrenalina (Jalava et al., 1993).

Diferenciació amb àcid retinoic.

Donada la gran varietat de mètodes de diferenciació descrits, en aquest treball s'ha escollit la diferenciació amb àcid retinoic, que és un protocol establert i molt usat (Pahlman et al., 1990; Pahlman et al., 1984), i estudis preliminars van determinar una disminució del creixement i una major expressió de neurites en aquest tractament.

L'àcid retinoic (RA) i els compostos relacionats (retinoides) són derivats de la vitamina A implicats en la senyalització i l'embriogènesis i són inductors potents de la diferenciació morfològica i parada del creixement en neuroblastoma humà *in vitro* (Sidell, 1982; Sidell et al., 1983). Nivells elevats de retinoides provoquen parada del cicle cel·lular i del creixement i diferenciació morfològica en cèl·lules de NB (Reynolds and Lemons, 2001; Reynolds et al., 2003). Interaccionen amb els seus receptors nuclears induïnt diferenciació i apoptosi en diferents tipus cel·lulars. Es coneixen dos grups de receptors de RA involucrats en el creixement de cèl·lules tumorals: els receptors RAR (*retinoid acid receptor*) i els RXR (*retinoid X receptor*). Ambdós pertanyen al grup de factors de transcripció de la família d'hormones esteroides/tiroidees, que contenen dominis d'unió a RA i a DNA en seqüències consens. *All-trans retinoic acid* és l'inductor de diferenciació més usat i presenta elevada afinitat per a RARs.

No totes les línies cel·lulars derivades de NB es diferencien en resposta a RA, (Sidell et al., 1983). Algunes són resistents a la senyalització per RA, i contràriament al que es pensava això no té relació amb l'amplificació de N-myc, i la diferenciació per RA no altera els nivells de myc (Hammerling et al., 1987). La resistència a la maduració també pot ser usada com a classificació de les línies cel·lulars derivades de neuroblastoma. La línia cel·lular derivada de neuroblastoma humà SH-SY5Y és un exemple de línia poc invasiva, que no presenta amplificació de N-myc, expressa receptors de RA i es diferencia en resposta a RA (Carpentier et al., 1997).

En SH-SY5Y el tractament amb RA té un efecte a curt termini sobre la migració i la invasió (Joshi et al., 2006) i a llarg termini sobre la diferenciació i parada del creixement i la proliferació. S'aconsegueix la parada del cicle cel·lular a la fase G₁ mitjançant l'estabilització de l'inhibidor de ciclins depenents de quinases (p27): s'indueix la degradació de la proteïna quinasa 2 associada a la fase S (skp2), activador del complex ubiquitina lligasa encarregat de la degradació de p27, a través de l'APC (complex promotor de l'anafase) (Cuende et al., 2008). S'indueixen canvis morfològics obtenint cèl·lules més disperses, polaritzades i amb més processos neuronals/neurites (Pahlman et al., 1984). S'indueix l'activació de proteïnes relacionades (com

metaloproteases de matriu, que medien la invasió i angiogènesis, i el creixement de dendrites); l'activació de transglutaminases i el lleuger increment dels marcadors neuronals com l'enolasa específica de neurones (NES), sinaptofisina i proteïna-97 associada a sinapsis, disminueix l'expressió de l'inhibidor de la diferenciació (Cheung et al., 2009), redueix el factor de transcripció *human achaete-scute homologue 1* (HASH-1) que intervé en el desenvolupament de neurones (Grynfeld et al., 2000). No obstant sembla una diferenciació limitada (Cheung et al., 2009; Joshi et al., 2007). El RA sembla promoure la supervivència (resistència a apoptosi) i reduir la susceptibilitat a neurotoxines incrementant l'expressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl2 (Wenker et al., 2010) pel que sembla via Akt (Cheung et al., 2009; Ronca et al., 1999) així que alguns autors suggereixen l'estudi de neurotoxicitat amb SH-SY5Y sense diferenciar.

Generalment les cèl·lules de SH-SY5Y es diferencien usant acid *all-trans* retinoic seguint un protocol clàssicament establert, amb variacions de concentració del producte i durada de la diferenciació (1-10 μ M, 2-7 dies) (Cheung et al., 2009; (Kim et al., 2005); (Shen et al., 2007); (Ohno et al., 2007).

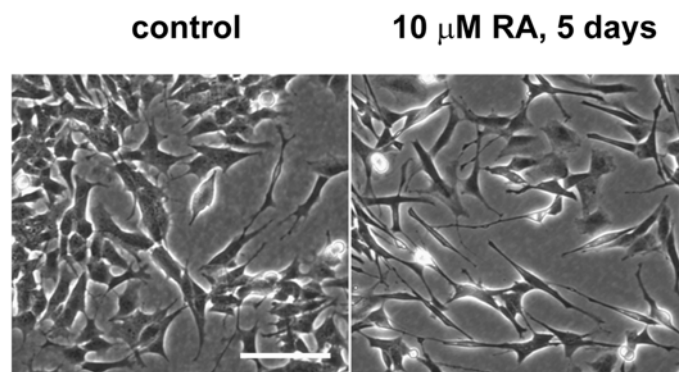


Fig. 4. Diferenciació de les cèl·lules SH-SY5Y amb RA 10 μ M 5 dies (la barra blanca representa 100 μ m).

2.3.2. Aplicacions en l'estudi de la hipòxia-isquèmia

L'estudi de la hipòxia en les cèl·lules SHSY5Y s'ha realitzat tant en l'àmbit d'estudi de la resistència a hipòxia tumoral com en la isquèmia cerebral.

La hipòxia en les cèl·lules de neuroblastoma indueix a la pèrdua de marcadors neurals/neuroendocrins, associats a un estat diferenciat com Neuropèptid Y, Cromogranina A i B, i indueix l'expressió de marcadors de crestes neurals (Holmquist et al., 2005). En el cas de SH-SY5Y no s'alteren nivells de factors de transcripció implicats en desenvolupament i especialització de llinatge "*early simpatic*" i tampoc

varien nivells de marcadors neuroendocrins (Jogi et al., 2002; Jogi et al., 2004). Les cèl·lules SH-SY5Y es poden sotmetre a un ampli rang d'hipòxia (21,5,1,0 % O₂) durant llargs períodes de temps (Jogi et al., 2002), on s'ha determinat l'activació de calpaïna en la privació de glucosa i sèrum en hipòxies lleus i perllongades (2%-5% O₂, 24-48h) en SH-SY5Y diferenciades amb RA.

SH-SY5Y s'han usat en l'estudi de l'estrés metabòlic i la hipòxia en tumors sòlids. S'ha creat un model d'hipòxia i privació metabòlica en tumors sòlids, on es detecta la supervivència de les cèl·lules distribuïdes en un model de "sandwix", creant un gradient de distribució de gasos i metabòlits. S'estudia la distribució de la mortalitat i es defineix una zona viable i una "clara" (on l'elevada mortalitat fa que no hi hagi cèl·lules presents) alterant l'aport de gasos i metabòlits i la durada de l'estímul (Prabhakaran et al., 2004). La privació d'oxigen sembla el factor més rellevant en aquest estudi, i la mortalitat activada per la via mitocondrial incrementa amb estímuls més severals tal com és d'esperar.

En cèl·lules SHSY5Y no diferenciades l'anòxia en presència de glucosa incrementa els nivells de neuroglobina i la OGD els de citoglobina. Quan es força la disminució o l'increment d'aquests nivells, els nivells de peròxid d'hidrogen incrementen o disminueixen respectivament. La inhibició de l'expressió de citoglobina redueix la supervivència després de l'OGD. Sembla que la neuroglobina i la citoglobina protegeixen de la mort cel·lular per hipòxia actuant com a segrestadors de radicals d'oxigen (Fordel et al., 2006; Fordel et al., 2007). En condicions de privació d'oxigen s'indueix principalment necrosi, però en la posterior reoxigenació s'incrementa l'apoptosi (Fordel et al., 2007).

Les cèl·lules SH-SY5Y sotmeses a hipòxia presenten inducció dels factors de resposta a hipòxia HIF1 (Guo et al., 2009; Hussein et al., 2006) i HIF2 (Holmquist-Mengelbier et al., 2006; Holmquist et al., 2005; Nilsson et al., 2005), sembla que en condicions diferents, ja que aquest darrer ho fa de manera mantinguda en concentracions d'oxigen més elevades i és per això que s'estudia més en relació a la hipòxia en tumors mentre HIF1 sembla de resposta més immediata i per tant en relació a l'adaptació metabòlica a la hipòxia.

2.4.Mort cel·lular en la isquèmia

En l'ictus isquèmic es distingeixen el nucli isquèmic (principalment de mort necròtica) i la penombra, on s'han identificat múltiples mecanismes que contribueixen a la mort cel·lular i per tant es considera una zona potencialment salvable. Tot i que clàssicament s'han exposat l'apoptosi i la necrosi com dos processos morfològicament i bioquímicament diferents, actualment s'han observat fenòmens intermitjos i interrelació entre els dos mecanismes, i generalment la distinció entre els diferents processos de mort no resulta fàcil.

2.4.1. Mort necròtica:

La mort necròtica s'associa a un fenomen passiu, no organitzat. En la isquèmia la necrosi afecta principalment les cèl·lules del nucli isquèmic. La disminució de l'energia i la consegüent pèrdua del gradient iònic pel mal funcionament de la membrana presents en la isquèmia causen l'entrada d'aigua i l'edema cel·lular; l'alteració del potencial de membrana mitocondrial, l'alteració d'ions com calci que indueix l'activació d'enzims lítics que destrueixen components cel·lulars i la lisi de la membrana amb la consegüent alliberació al parènquima del contingut cel·lular desencadenant la resposta inflamatòria que amplifica el dany i alterant l'estabilitat de les cèl·lules veïnes. La mort necròtica presenta trencament irregular del DNA, alteració de la homeostasi d'ions, floculació de la cromatina, inflamament cel·lular, i una important destrucció de la membrana. Les cèl·lules després de la isquèmia cerebral tenen els mitocondris danyats. El mitocondri produeix radicals d'oxigen, que en condicions normals són processats però poden ser la causa de dany després de la isquèmia o en malalties neurodegeneratives. La dissipació del potencial sembla ser causada per falta d'energia, que condicionaria a mort necròtica. (Iijima, 2006).

Generalment la necrosi s'associa a les proteïnes "calpaïnes", família de cisteïna proteases activades per calci a pH neutre. (Calpaina: *calcium dependent protease with papain like activity*). L'activació de la calpaïna pot ser fisiològica o patològica ja que hi ha moltes patologies que cursen amb increment de calci. Són rellevants en malaltia d'Alzheimer, Parkinson i Huntington, i isquèmia, entre d'altres. Les calpaïnes són molt abundants al sistema nerviós central. Existeixen diferents membres de la família, però les més conegudes i d'expressió ubíqua són la m i la μ calpaina (anomenades així depenent de la concentració de calci requerida per a la seva activació: milimolar i micromolar respectivament). S'expressen en condicions normals en la forma inactiva i

en concentracions elevades de calci s'activen per l'autocatàlisi que indueix un canvi conformacional mantenint present la subunitat catalítica i la reguladora en la proteïna activa. Funcionen com heterodímers, i presenten especificitat de substrat (aprox. un 5% de les proteïnes cel·lulars). Exemples de dianes de calpaines són proteïnes del citoesquelet (espectrina, proteïnes del neurofilament), proteïnes associades a membranes (bombes iòniques, receptors), enzims de senyal de transducció, factors de transcripció (Carafoli and Molinari, 1998; Liu et al., 2000; Liu and Linn, 2000; Wang, 2000).

2.4.2. Mort apoptòtica

La mort apoptòtica també és anomenada mort cel·lular programada, i es considera un procés actiu i específic. El terme apoptosi va ser adoptat per descriure la mort cel·lular associada a una fragmentació característica del DNA genòmic (Kerr et al., 1972) i posteriorment es van observar més característiques (Willies and Woolf, 1980) i es va associar al programa de mort cel·lular (Ellis and Horvitz, 1986) basant-se en estudis en *C.elegans*, on els components centrals del programa de mort cel·lular són tres proteïnes CED(*cell death abnormal*): CED3, CED4 i CED9. CED4 s'uneix a CED3 i l'activa, 3 i 4 són proapoptòtics i CED9 actua com a inhibidor de la seva interacció. Les proteïnes homologues a aquestes en mamífers regulen l'apoptosi. Els homòlegs de CED9 són la família Bcl2 (*B-cell lymphoma protein 2*); de CED4 són APaf1/NODlike R; de CED3 són la família caspases (Miura et al., 1993; Zou et al., 1997).

La mort apoptòtica és un fenomen que juga un paper en el desenvolupament cel·lular, de manera fisiològica i també és present en algunes patologies. L'apoptosi durant la isquèmia cerebral es desencadena com a resposta cel·lular a diferents estímuls com l'increment de calci, el glutamat, la presència de radicals lliures o citokines. Els canvis morfològics típics de l'apoptosi són diferents d'aquells associats a necrosi, com per exemple la reducció del volum citoplasmàtic, la preservació de les membranes, la fragmentació del DNA seguint un patró característic, la condensació de la cromatina, el col·lapse del citoesquelet i la formació dels cossos apoptòtics. La membrana cel·lular no es lisa, però es divideix per formar vesícules, anomenades "cossos apoptòtics", que seràn fagocitats per macròfags o cèl·lules veïnes sense activar reacció inflamatòria. La formació dels cossos apoptòtics és un procés essencial per l'empaquetament dels components cel·lulars i permetre una eliminació sense activar resposta inflamatòria que alteri l'ambient extern cel·lular i la viabilitat de les cèl·lules circumdants. Aquesta és una característica rellevant de la via apoptòtica de mort cel·lular, ja que a diferència de la necrosi, el reticle endoplasmàtic rugós (RER) i la membrana plasmàtica es mantenen

intactes i no existeix reacció inflamatòria perquè no s'expulsa material cel·lular. És per això que l'apoptosi representa un tipus de mort més controlada i delimitada, i la majoria d'estudis es centren en evitar la necrosi i direccionar la mort cel·lular cap a un tipus de mort més apoptòtic, per tal de tenir un dany més concret i evitar el dany generalitzat i l'increment de la lesió al teixit.

Els trets moleculars de l'apoptosi són molt variats depenent de la via d'activació, alguns d'ells són: despolarització de la membrana, activació de caspases, alliberació de factors proapoptòtics del mitocondri com citocrom c o AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), pèrdua de l'asimetria de fosfolípids de la membrana (s'exterioritza fosfatidilserina a la membrana, que serà detectada per les cèl·lules fagocítiques, condensació de la cromatina, fragmentació de DNA, i la formació dels cossos apoptòtics. (Mattson et al., 2000).

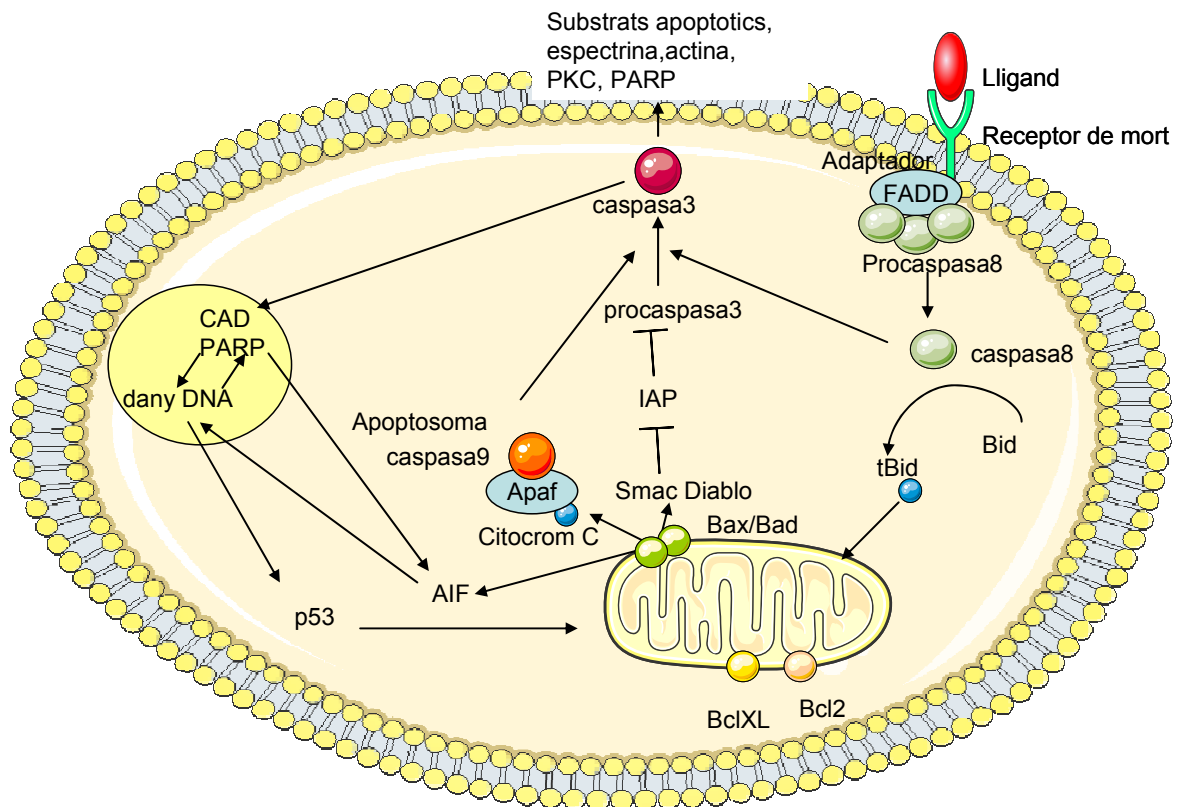


Fig. 6. Esquema de vies apoptòtiques dependents i independents de caspases

L'apoptosi més coneguda en relació a la isquèmia cerebral és la que involucra les proteïnes caspases(cysteiny aspartate proteinases), però recentment també s'ha descrit una mort apoptòtica independent de caspases. En la penombra es descriuen tant vies de senyalització apoptòtiques depenent com independents de caspases (Ferrer et al., 2003).

2.4.2.1. Apoptosi dependent de caspases

La detecció de l'homologia de seqüència i funcional de CED-3, essencial pel desenvolupament dels programes de mort en *C elegans* (Horvitz, 1999; Thornberry et al., 1992), amb la caspasa 1 humana (“*interleukin1 beta converting enzyme*” ICE) (Yuan et al., 1993) va iniciar l'estudi exhaustiu del mecanisme apoptòtic. La seva sobreexpressió és suficient per causar apoptosi en cèl·lules de mamífer (Miura et al., 1993; Li and Yuan, 2008). A partir d'aquesta es van descriure les altres proteïnes de la família caspasa, relacionades amb l'apoptosi.

Les proteïnes de la família de caspases es classifiquen segons l'especificitat pel substrat, similaritat de seqüència i estructura. Poden ser agrupades segons la seva funció (pro-apoptòtiques: caspasa 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 i pro-inflamatòries: 4, 5, 11, 12), però és una classificació simplista, perquè existeix certa interrelació. La classificació més clara és segons la seva funció, així es determinen caspases iniciadores que activen la cascada de caspases (2,4,5,8,9,10,11,12) o efectores que culminen amb la mort cellullar (principalment la caspasa 3, en menor grau 6 i 7). La caspasa 8 és coneguda com la iniciadora de la via extrínseca d'activació de receptors de mort i la caspasa 9 es relaciona amb l'activació de la via intrínseca mitocondrial. La caspasa 3 és la principal caspasa efectora, i presenta estructura similar amb la caspasa 6 i 7, però mentre caspasa 3 i 7 comparteixen preferència pel substrat (DEVD: Asp-Glu-Val-Asp) caspasa 6 té preferència per un substrat diferent (VEHD: Val-Glu-His-Asp), i la seva funció no està molt clara, ja que animals *Knock out* (KO) per a caspasa 6 es desenvolupen correctament, tot i que sembla intervenir en el processament d'algunes proteïnes nuclears.

La seva funció es pot relacionar amb l'estructura: les caspases iniciadores poden interaccionar amb molècules adaptadores *upstream* i per tant presenten prodominis més llargs, que contenen dominis per a la interacció amb proteïnes, com el domini d'interacció proteïna-proteïna *Death effector Domain*:DED (com en el cas de caspasa 8 i 10) o el domini de reclutament d'altres caspases *Caspase Activation and Recruitment Domain*: CARD (com en el cas de caspasa 2, i 9) (Li and Yuan, 2008).

En condicions normals les caspases estan presents en la cèl·lula en la forma inactiva que consta de 3 dominis: prodomini N-terminal i dominis p20 (20kDa) i p10 (10kDa). L'activació per tall proteolític allibera del prodomini. La forma activa és un homodímer (Riedl and Shi, 2004), que forma una estructura de 4 *loops*, dos dels quals estan poc conservats entre les diferents caspases i determinen l'especificitat pel

substrat: es formen “butxaques”, dues de les quals tenen preferència per uns residus determinats (Li and Yuan, 2008). La zona catalítica és una seqüència conservada al domini p20 que conté una cisteïna activa. Es reconeix una seqüència específica de quatre aminoàcids contigus, i talla el substrat posteriorment a un residu Aspartic (Asn) a la part Cterminal d’aquesta seqüència.

Les caspases poden activar o inhibir el substrat, ja sigui pel processament directe o actuant sobre un inhibidor (p.ex. caspasa-3 talla la subunitat inhibidora ICAD unida a la DNAsa *Caspase-Activated DNase*, CAD). La seqüència diana per a cada una de les caspases es va definir *in vitro* amb una llibreria combinatòria. (Thornberry et al, 1997, Kang et al 2000). Els substrats de caspases inclouen proteïnes estructurals, reguladors de la transcripció i traducció, quinases, intermediaris de la senyalització (Mattson et al., 2000). No obstant, les caspases iniciadores són més específiques mentre les efectores s’encarreguen de la proteolisis general per a culminar amb la mort cel·lular al final de l’apoptosi (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Activació de les caspases

La lisi d’una procaspasa mediada per una caspasa iniciadora l’activa, creant així una cascada d’activació de caspases que amplifica la resposta fins arribar a les caspases anomenades efectores, que actuen sobre altres substrats diferents de les propies caspases. Per explicar l’activació de les caspases iniciadores es descriuen altres mecanismes centrats en la interacció proteïna-proteïna a través de dominis específics: l’activació induïda per proximitat (l’acumul de la procaspasa indueix l’autocatalisis) basada en la interacció a través del domini DED com s’ha descrit per procaspasa 8; l’associació amb una altra proteïna que funciona com a subunitat reguladora del complex com és el cas de procaspasa 9, que interacciona amb la proteïna Apaf1 a través del domini CARD per formar l’apoptosoma, per activar-se.

Es coneixen dues principals vies d’activació de les caspases, la via extrínseca i la via intrínseca.

- *La via extrínseca: receptors de mort*

Implica l’activació de les proteïnes de la superfamília de receptors transmembrana de mort (Lavrik et al., 2005). Aquests contenen un domini citoplasmàtic de mort Death Domain (DD) que facilita la formació de complexes de senyalització que contenen la molècula adaptadora FADD (Fas associated death domain protein) i múltiples proteïnes procaspasa 8, que s’activen per autocatalisis. En algunes cèl·lules s’amplifica la resposta

processant Bid (tBid), que activa la via intrínseca (mitocondrial) (Li and Yuan, 2008). Factors que indueixen la supervivència cel·lular incrementen proteïnes inhibidores d'aquesta via que contenen el domini DED i interaccionen amb FADD competint amb la procaspasa 8 (Kumar, 2007).

- *La via intrínseca : via mitocondrial*

La caspasa 9 és un component clau de l'activació de la via intrínseca, que és regulada per les proteïnes de la família Bcl2 (*B-cell lymphoma protein2*) i BH3-only (*Bcl2 homology domain 3*). El mitocondri és la font energètica de la cèl·lula; la seva funció primària és generar adenosina trifosfat a través de la cadena de transport d'electrons i la fosforil·lació oxidativa (OxPHOS), però pot actuar com a inductor de la mort apoptòtica. Aquesta via s'inicia per estímuls de mort com dany al DNA, o productes citotòxics que indueixen l'alteració de l'equilibri mitocondrial, la permeabilització de la seva membrana externa i l'alliberació al citoplasma de proteïnes de l'espai intermembranal mitocondrial.

L'activació de les caspases depèn de l'equilibri entre les senyals pro apoptòtiques (família Bcl2 i BH3only: Bax, Bad, Bid, Bclxs) i les de supervivència (família BCL2: BCL2 i BCLxl)(Jonas, 2009). Les proteïnes de la família BCL2 tenen propietats de canals iònics, i en condicions fisiològiques les proteïnes antiapoptòtiques inhibeixen les proapoptòtiques per dimerització; però després d'un senyal de mort es perd l'equilibri ja sigui perquè s'incrementa l'expressió de les pro-apoptòtiques, disminueixen els nivells de les antiapoptòtiques o bé són segrestades. Llavors les pro-apoptòtiques dimeritzen entre elles, induint l'obertura del porus de la membrana mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pore*, mPTP), que implica la permeabilització de la membrana i l'alliberació de factors proapoptòtics com citocrom c i AIF (*Apoptosis inducing factor*)(Jonas, 2009).

Sembla que la formació del porus implica ANT (*adenine nucleotide translocase*), el canal dependent de voltatge VDAC (*voltage-dependent anion channel*) i la ciclofilina D. El VDAC està present en la membrana externa en una posició privilegiada per correlacionar el metabolisme mitocondrial i el cel·lular. Donat que el diàmetre de porus de VDAC és insuficient perquè hi pugui passar el citocrom c, s'hipotetitza que la formació de porus de VDAC amb proteïnes pro-apoptòtiques (com Bax i Bak) permetent l'alliberament de citocrom c. El procés la formació del porus no està molt clar però la hipòtesis més extesa és la que implica la membrana externa i la interna en la formació del porus (Jonas, 2009).

El citocrom c és una proteïna de 13 kDa que en condicions fisiològiques intervé en la respiració. Un cop alliberat del mitocondri per estímuls apoptòtics s'associa a Apaf1 i procaspasa9 per formar el complex heptamèric actiu de l'apoptosoma que inclou el cofactor dATP/ATP, i activa la caspasa executora caspasa 3 (Li et al, 1997)(Zou et al., 1997). Apaf-1 és una proteïna d'aproximadament 135kDa que conté un domini N terminal de reclutament de caspases CARD, que interacciona amb caspasa 9, i una regió Cterminal que interacciona amb citocrom c. El complex de l'apoptosoma consta de set molècules de Apaf 1 i set dimers de caspasa 9 i sembla que ATP facilitaria l'exposició del domini CARD de citocrom c/Apaf-1 perquè interaccioni amb procaspasa 9 (Li et al., 1997). Els ratolins deficientes en citocrom c moren a l'úter però línies cel·lulars establertes a partir d'aquests embrions compensen la deficiència en el metabolisme oxidatiu i són viables, i mostren una activitat caspasa 3 reduïda i resistència a estímuls apoptòtics (Li et al., 2000).

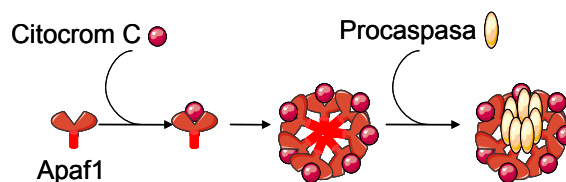


Fig. 5. Esquema de la formació del complex de l'apoptosoma basat en (Ow et al., 2008).

La inducció d'un increment de Bcl2 i BclXL evita l'alliberació de citocrom c tot i la presència d'estímuls apoptòtics en diversos tipus cel·lulars. L'increment de l'expressió de Bcl2 evita el desplaçament de Bax al mitocondri i l'alliberació de citocrom c induïts per estímuls apoptòtics com estaurosporina (Yamashita et al., 2003). L'inducció de BclXL permet l'adaptació a estímuls apoptòtics com estaurosporina mantenint un potencial de membrana disminuït (Vander Heiden et al., 1997). Bcl2 actúa sobre el mitocondri inhibint l'alliberament de citocrom c tant en estudis fóra de la cèl·lula com en estudis amb cèl·lules intactes prevenint la inducció d'apoptosi davant una gran varietat d'estímuls (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997). S'ha descrit el paper protector de Bcl2 *in vitro*, prevenint de l'apoptosi davant estímuls com falta de factors de creixement (NGF), pèptid beta-amiloide o estímuls oxidatius (Mattson et al., 2000). El citocrom c és essencial per a dur a terme aquest procés apoptòtic i cèl·lules apoptòtiques presenten distribució descompensada de citocrom c, molt al citosol i menys al mitocondri. (Yang et al., 1997). Els estímuls pro/anti apoptòtics condicionen

el balanç entre proteïnes pro i antiapoptòtiques, un exemple és p53 que s'activa per dany al DNA i indueix alliberament del citocrom C desplaçant-se al mitocondri (Endo et al., 2006) i activant la síntesis de novo de proteïnes proapoptòtiques com Bax, Bid. Els factors de creixement indueixen l'increment de les proteïnes antiapoptòtiques (Bcl2, BclXL) i activen la fosforil·lació de Bad, que n'impedeix la interacció amb Bcl2 antiapoptòtiques (Ueda and Fujita, 2004).

Els animals K.O. per a les diferents caspases són informatius per a la seva funcionalitat. El fenotip d'animals deficients de caspasa 3 o de caspasa 9 és variable depenent del soca, però presenten característiques semblants d'hiperplasia del teixit nerviós degut a la poca mortalitat cel·lular i resistència a la mort cel·lular (Kuida et al., 1996) , fet que fa pensar que ambdues intervenen en una mateixa via. Animals deficients en Apaf1 o amb citocrom c incapaç de formar l'apoptosoma mostren reducció de l'activació de caspasa 3 i resistència cel·lular a estímuls apoptòtics (Kumar, 2007).

Es coneixen unes proteïnes que funcionen com a inhibidors de l'activació de caspases anomenades *IAP-like*, però només una d'elles inhibeix caspases en concentracions fisiològiques i no està clar que tinguin un paper rellevant. En l'activació de l'apoptosi proteïnes alliberades del mitocondri com interaccionen amb els inhibidors inactivant-los.

La via extrínseca i intrínseca convergeixen en l'activació de caspasa 3, a través de caspasa 8 i caspasa 9 respectivament (Hengartner, 2000). La caspasa 3 és la principal caspasa efectora (Porter and Janicke, 1999) que actua sobre proteïnes com PARP (proteïna nuclear encarregada de la reparació del dany nuclear), lamines nuclears, espectrina, i causa la fragmentació del DNA activant la DNasa CAD (Enari et al., 1998; Sakahira et al., 1998).

Existeixen evidències de la presència de mort apoptòtica depenent de caspases en la isquèmia. S'ha determinat l'increment de caspasa 3 (mRNA) després d'isquèmia focal en rates, l'increment de caspasa 3 activada en ratolins després d'isquèmia focal, i l'activació de caspasa3 en estudis d'isquèmia *in vitro* (Nath et al., 1998). La inhibició de les caspases ha resultat neuroprotectora, i sembla que podria ser una aplicació que incrementés la finestra terapèutica per a l'ictus. En humans, s'incrementa també caspasa3 després de la isquèmia (Broughton et al., 2009) i els ratolins deficients en caspasa3 són més resistents a l'estrés isquemic *in vivo i in vitro* (Le et al., 2002). Hi ha evidències de l'alliberament de citocrom c després de la inducció d'isquèmia cerebral, tant transitòria com focal en rates, i també és present la formació del complex de

l'apoptosoma i l'activació de la caspasa 9 després d'isquèmia global i focal. En un model d'isquèmia transitòria global p53 transloca al mitocondri, i s'uneix a BclXL es dona aliberament de citocrom C i apoptosi (Endo et al., 2006). Disminuir els nivells de p53 protegeix del dany isquèmic (Crumrine et al., 1994). Bax s'incrementa després de la isquèmia global (mRNA, proteïna), i focal (proteïna). La sobreexpressió de Bcl2 en neurones corticals redueix el dany en isquèmia *in vivo* (Linnik et al., 1995) i ratolins transgenics que sobreexpressen Bcl2 mostren major resistència neuronal al dany isquèmic (Kitagawa et al., 1998).

2.4.2.2. Apoptosi independent de caspases

Més recentment s'ha descrit la via de mort apoptòtica independent de l'activació de caspases. La primera proteïna mitocondrial detectada que media mort cel·lular independent de caspases és AIF. En condicions fisiològiques AIF intervé en l'OxPHOS, el control de redox i és indispensable per la supervivència cel·lular, proliferació i integritat mitocondrial (Hangen et al.; Joza et al., 2009). Conté un MLS (*mitochondrial localization signal*) que el dirigeix a l'espai intermembrana de mitocondri, on s'uneix a part externa de la membrana interna. Posteriorment a la permeabilització de la membrana mitocondrial externa característica de la majoria d'estímuls apoptòtics, AIF s'allibera i transloca al nucli, on indueix la degradació de DNA amb un patró característic produint fragments grans (aprox 50kb) (Joza et al., 2009; Susin et al., 1999)

AIF es relaciona amb la mort cel·lular a partir d'estudis genètics on la falta d'AIF induïx tardança en la mort programada en el desenvolupament (Wang et al., 2002). La microinjecció d'AIF al citoplasma de cèl·lules intactes induïx la condensació de cromatina, dissipació del potencial de membrana i exposició de la fosfatidilserina, efectes que no es reverteixen amb la inhibició de les caspases (Susin et al., 1999). En casos de dany al DNA s'activa l'enzim nuclear Poly(ADP-ribose)polimerasa 1 (PARP1) que forma polimers de (ADP-ribose) en proteïnes acceptores (histones, DNAPolimerases, DNA lligases, i PARP1 mateix) per facilitar la reparació del DNA. En cas de dany excessiu, PARP1 contribueix al programa de mort, implicant consum de NAD⁺ i baixada d'ATP. AIF media la mort activada per PARP en situacions d'estrès oxidatiu, agents alquilants, i isquèmia (Moubarak et al., 2007; Yu et al., 2002; Wang et al., 2004). Les neurones corticals deficientes en PARP1 no transloquen AIF (Yu et al.,

2002). Piruvat, alfacetoglutarat i altres prevenen la mort activada per PARP (Ying et al., 2002).

L'apoptosi independent de caspases també és present en la isquèmia. S'ha descrit la translocació d'AIF al nucli de neurones danyades després de la isquèmia cerebral, i la inhibició d'AIF redueix la mort cel·lular (Culmsee et al., 2005). La inhibició de PARP1 disminueix la localització d'AIF al nucli, i ratolins amb baixos nivells de PARP presenten infarts majors. Sembla que l'activació de la calpaïna indueix l'alliberament d'AIF (Polster et al., 2005; Yu et al., 2002) i l'expressió d'una proteïna AIF resistent al processament evita l'alliberament d'AIF i dona resistència a la mort en OGD (Cao et al., 2007). En models d'isquèmia cerebral els ratolins Harlequin (Hq), que presenten poca expressió de la proteïna com a conseqüència d'una inserció en el gen AIF gen del cromosoma X (Klein et al., 2002) mostren una dramàtica reducció en el volum d'infart, i les seves cèl·lules Hq són resistents a la mort per activadors de PARP (Culmsee et al., 2005; Yu et al., 2006a; Zhu et al., 2007). S'hipotetitzava que en isquèmia s'activa la via de mort programada i si la cèl·lula no té suficient energia per activar caspases es porti a terme la via independent de caspases (Graham and Chen, 2001).

2.5. Metabolisme cel·lular de la Glucosa en normòxia i adaptació a la hipòxia

Al cervell adult la glucosa és la principal font d'energia. En condicions aeròbiques la cèl·lula obté energia mitjançant la glicòlisis aeròbica, i el metabolisme oxidatiu mitocondrial del cicle de Krebs o cicle dels àcids tricarboxílics (TCA).

La glicòlisis metabolitza la glucosa a piruvat. La tasa glicolítica és controlada a diferents nivells i per diferents mecanismes: aport de substrats, concentracions d'enzims, efectors al·lostèrics, i modificacions d'enzims reguladors. El piruvat obtingut entra al mitocondri, on és metabolitzat a acetilCoenzima A (acCoA) per l'enzim Piruvat deshidrogenasa. Aquest entra al TCA i interacciona amb oxalacetat per formar citrat, que es descarboxila produint alfaetoglutarat, que després passa a succinat i finalment a malat i oxalacetat. Aquest torna a interaccionar amb una molècula de AcCoA per continuar el cicle. En aquest procés es produeix poca energia en forma d'ATP, però la finalitat d'aquest cicle és la producció de productes amb molta capacitat reductora (NADH i FADH₂). El piruvat també pot entrar al TCA per carboxilació catalitzada per la Piruvat carboxilasa, enzim específic d'astròcits i només algunes neurones, que requereix CO₂ i produeix oxalacetat.

NADH i FADH₂ produïts s'oxiden a la cadena de transport d'electrons, creant un gradient de protons al llarg de la membrana mitocondrial interna que és usat per l'enzim ATP sintasa per obtenir ATP a partir d'ADP. Així, en condicions fisiològiques i de normòxia, es produeix ATP per glicòlisis i posterior fosforil·lació oxidativa. El transport d'electrons es fa de manera ordenada. La cadena de transport d'electrons capta els electrons de NADH i H⁺ mitjançant el complex I i del succinat pel complex II. Una parella d'electrons es transfereix consecutivament a ubiquinona, al complex III, al citocrom c i finalment al complex IV, on els dos electrons es transfereixen a un àtom d'oxigen per produir aigua. El moviment dels protons a favor de gradient través del transportador de protons acoplat a ATP sintasa fosforil·la ADP per produir ATP. L'eficiència d'acoplament ve determinada per l'eficiència amb què es vincula la movilització dels protons fóra de la matriu mitocondrial amb la producció d'ATP. A més desacoblament, menor producció d'ATP i major de calor. La fosforil·lació oxidativa és la major productora de ROS. En cas de mal funcionament de la cadena de transport d'electrons aquests queden desaparellats o en excés i s'uneixen directament amb l'oxigen formant el radical superòxid (O₂^{·-}). Si els sistemes reguladors de l'estrés

oxidatiu no funcionen correctament aquest pot derivar en radical hidroxil, espècie molt reactiva.

El mitocondri consumeix oxigen i catabolitzametabòlits per a l'obtenció d'energia, i l'aport tant de nutrients com d'oxigen són essencials. Durant la hipòxia, la respiració mitocondrial disminueix per la falta d'oxigen i les cèl·lules fan un canvi cap a un fenotip bàsicament glicolític. El piruvat obtingut de la glicòlisis no es dirigeix al mitocondri sinó a la producció de lactat i NAD⁺ per reacció amb NADH citosòlic, amb el consegüent canvi de pH. Aquesta adaptació metabòlica és molt complexa i implica la supressió del catabolisme mitocondrial del piruvat i el consum d'oxigen, alhora que incrementar la captació de glucosa i la glicòlisis. Això s'aconsegueix regulant l'expressió d'enzims del metabolisme de la glucosa, regulats per el factor induït per Hipòxia 1(HIF1)(veure apartat corresponent).

A l'infart cerebral la tasa de metabolisme oxidatiu pot ser un control de la supervivència, amb un llindar mínim de reducció per a la viabilitat del teixit. Els nivells de lactat són majors en la zona de penombra que en el nucli, degut al flux residual. En la isquèmia l'estat energètic del teixit es troba compromès, perquè tot i l'elevada tasa glicolítica induïda pel fenotip glicolític, aquest sistema és menys eficient que l'oxidatiu. El metabolisme neuronal es veu més afectat en la isquèmia que l'astrocític, ja que els astròcits s'adapten millor, poden metabolitzar altres substrats i combaten millor l'estrés oxidatiu (Hertz, 2008).

En moltes cèl·lules tumorals s'ha determinat aquest fenotip glicolític en condicions de normòxia, és el que es coneix com efecte Warburg (Bartrons and Caro, 2007; Semenza, 2007; Wallace, 2005; Warburg, 1956). Aquestes cèl·lules presenten una tasa glicolítica molt elevada, que dirigeixen preferencialment a la producció de lactat, i un compromís de la respiració mitocondrial en condicions de normòxia. El pH intracel·lular i extracel·lular s'incrementa com a conseqüència de l'elevada producció de lactat. Es coneixen alguns oncogens que per diferents vies determinen aquest fenotip glicolític, entre els quals hi ha Akt, p53 o HIF.

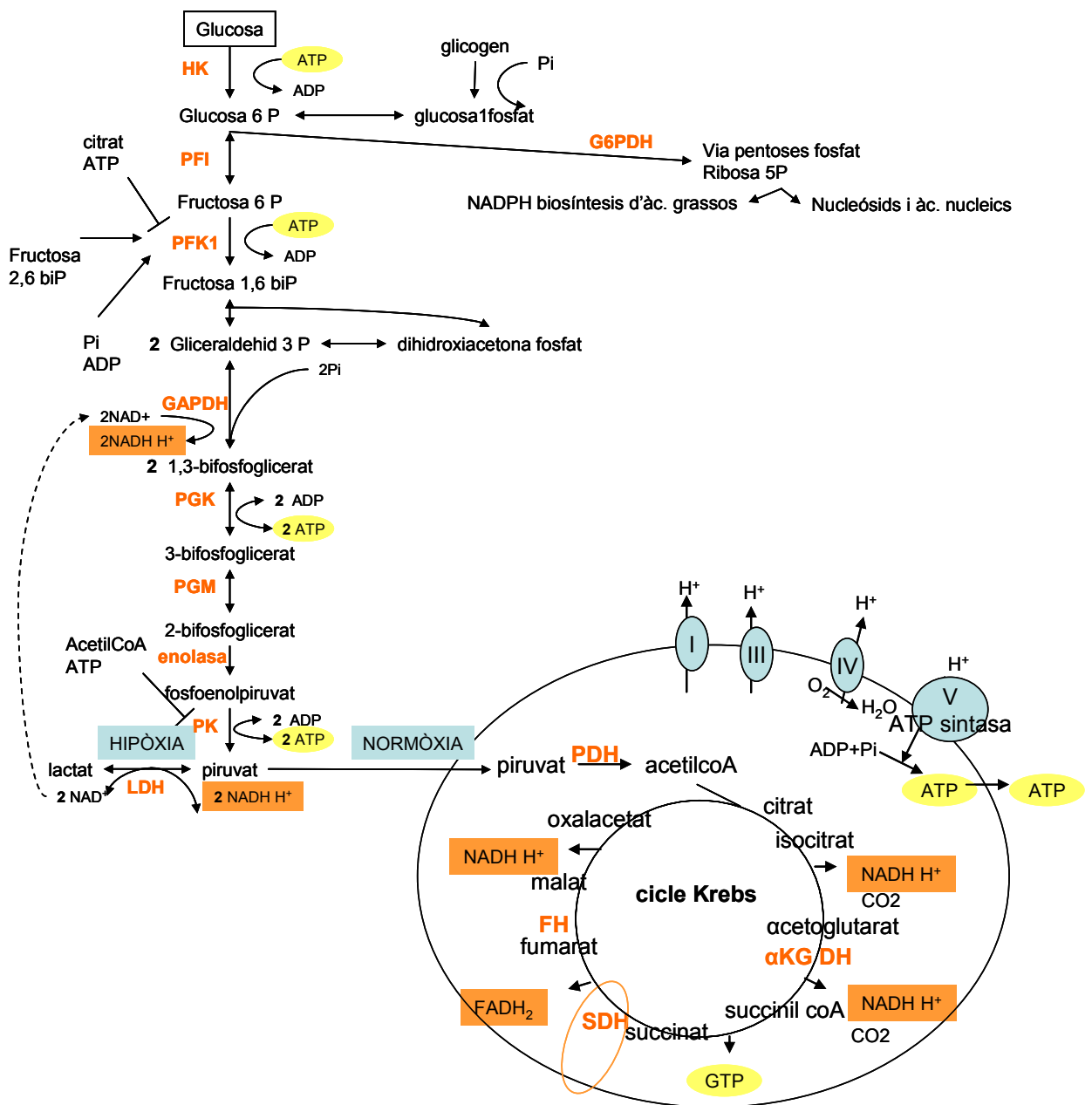


Fig. 7. Esquema del metabolisme de la glucosa en condicions de normòxia i hipòxia. Enzims: HK (Hexoquinasa), PFI (fosfructoisomerasa), PFK1 (fosfofructoquinasa), GAPDH(gliceraldehid fosfat deshidrogenasa), PGK (fosfoglicerat quinasa), PGM (fosfoglicerat mutasa), PK (piruvat quinasa), PDH (Piruvat deshidrogenasa), α KGDH (alfa cetogluarat deshidrogenasa), SDH(succinat deshidrogenasa), FH (fumarat deshidrogenasa), G6PDH(Glucosa 6 fosfat deshidrogenasa), NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide), GTP (Guanosine Triphosphate), ATP(Adenosine Triphosphate).

2.6. Resposta a la hipòxia: paper del Factor Induïble per Hipòxia: HIF

L'aport inadequat d'oxigen pot conduir a la disfunció i mort cel·lular en organismes aeròbics. Donada la importància de l'oxigen per a la vida, s'ha desenvolupat sofisticats sistemes de distribució en organismes aeròbics superiors (sistema cardiovascular i respiratori). En la cèl·lula com a unitat individual existeix un sistema sensible de detecció de la pressió d'oxigen i un sistema de resposta ràpida. El factor **HIF** (*Hypoxia Inducible Factor*) és el principal organitzador d'aquesta resposta en condicions d'hipòxia (Semenza, 1999), que pot succeir en situacions fisiològiques (desenvolupament) i fisiopatològiques (isquèmia cerebral, cardíaca, tumors resistents a hipòxia,...). HIF és un factor de transcripció heterodimèric que s'activa en condicions d'hipòxia i indueix l'expressió de gens de resposta a hipòxia enfocats a l'adaptació cel·lular. El seu sistema de regulació és molt complex, ja que en presència d'oxigen la subunitat induïble (subunitat α) és degradada i no es pot formar l'heterodímer. En condicions d'hipòxia s'escapa de la degradació i el factor HIF indueix l'expressió gènica.

2.6.1. Descripció i regulació del Factor de transcripció HIF

HIF és un factor de transcripció heterodimèric constituït per una subunitat alfa i una beta. La subunitat beta (HIF1 β) és única i d'expressió constitutiva però es coneixen tres formes de subunitat alfa diferents en mamífers que s'indueixen en hipòxia (HIF1 α , HIF2 α i HIF3 α). (Wang et al., 1995; Wang and Semenza, 1995)

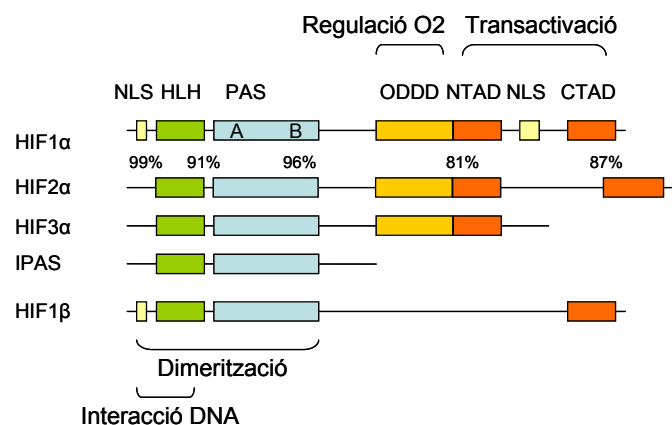


Fig. 8. Esquema de l'estructura de les diferents subunitats de l'heterodímer HIF.

Existeixen dominis compartits en algunes de les subunitats, com és el cas de dominis d'interacció per formar l'heterodímer (HLH-PAS), d'interacció amb DNA (*Helix Loop*

Helix,HLH), de transactivació (*C-Trans activation domain*, CTAD; *N-Trans activation domain*, NTAD), dominis de regulació per oxigen (*Oxygen-Dependent Degradation Domain*, ODDD) i seqüències d'import al nucli (*Nuclear Localisation Signal*, NLS):

Subunitat HIF1 β :

També anomenada ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), receptor de dioxina en resposta a químics xenobiòtics. Comparteix els dominis d'interacció amb DNA i de heterodimerització, però no conté el domini de regulació per oxigen, ja que és d'expressió constitutiva.

Subunitats α :

La subunitat HIF1 α és la més coneguda i estudiada relacionada amb la regulació del metabolisme cel·lular, i en la que es centra aquest estudi. HIF2 α va ser descrit posteriorment i també se l'anomena *Endothelial PAS domain protein* (EPAS). Els patrons d'expressió difereixen: EPAS principalment es troba al pulmó, en menor grau en cor, fetge i altres òrgans en normòxia, mentre HIF1 α (mRNA) és d'expressió ubiqüa però menor en normòxia. Es correlaciona EPAS amb VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) i desenvolupament pulmonar postpart (Ema et al., 1997; Tian et al., 1997; Stroka et al., 2001) La subunitat HIF3 α és la menys coneguda, però s'ha descrit una variant de *splicing* anomenada *Inhibitory PAS Domain* (IPAS), que no presenta domini transactivador i funciona com un inhibidor competitiu de HIF1 α i HIF2 α per a la formació de l'heterodímer, sense alterar-ne l'expressió. IPAS s'uneix a HIF1 α o HIF2 α impedit que interaccionin amb HIF1 β i per evitant la formació de l'heterodímer actiu (Makino et al., 2001). L'heterodímer format per la subunitat HIF1 β /1 α i HIF1 β /2 α funcionen com a activadors de la transcripció de gens per a la resposta cel·lular a hipòxia.

HIF1 α es transcriu constantment i la seva regulació és a nivell postranscripcional (Wenger et al., 1997). La síntesis de la subunitat α es manté en condicions d'estrés cel·lular per la presència al mRNA d'una seqüència IRES (*internal ribosome entry sites*) a 5'UTR(*untranslated region*), de manera que no necessita la iniciació de transcripció per *cap*, com la majoria de proteïnes.(Young et al., 2008)

La regulació de la funció de l'heterodímer ve determinada per la regulació de la subunitat α en normòxia. Aquesta pot patir moltes modificacions com fosforil·lació (algunes fosforil·lacions sembla que incrementen l'activitat transcripcional (Richard et al., 1999)), acetilació, SUMOilació (Webb et al., 2009; Wei and Yu, 2007) , que poden alterar l'estabilitat de la proteïna o la funcionalitat de l'heterodímer. Aquest és el cas per

exemple de la SUMOilació (conjugació de proteïnes petites *small ubiquitin like modifier* (SUMO) a proteïnes diana per un procés equivalent a la ubiquitinització, molt incrementat després de la isquèmia) (Lehman, 2009; Yang et al., 2008), ja que encara es desconeix si aquesta modificació comporta una major (Cheng et al., 2007) o menor estabilitat de la proteïna HIF1 α (Kaelin and Ratcliffe, 2008).

La modificació més estudiada és la hidroxilació. Es coneixen dues famílies d'hidroxilases que actuen sobre HIF:

- Factor Inhibidor de HIF: en condicions de normòxia *Factor Inhibiting HIF* (FIH-1) hidroxila un residu d'Asparagina conservada en la regió transactivadora Cterminal (CTAD) de HIF1 α i HIF2 α impeding la unió de coactivadors com p300 i CBP(cyclic-AMP-response-element-binding protein(CREB) binding protein) i inibint l'activitat de l'heterodímer. No altera l'estabilitat de la subunitat α , però sí l'activitat de l'heterodímer (Lando et al., 2002a; Lando et al., 2002b; Mahon et al., 2001). En hipòxia no es dona la hidroxilació i l'heterodímer pot actuar.
- Prolina Hidroxilases (PHDs): hidroxilen residus Prolina del domini ODDD. Intervenien en el sistema de degradació de la subunitat HIF α en normòxia, que inclou l'actuació seqüencial de PHDs i el sistema ubiquitina-proteasoma. La degradació de la subunitat α és el principal sistema de regulació d'activitat del factor HIF. En hipòxia aquesta hidroxilació no es dona i la subunitat α no es degrada.

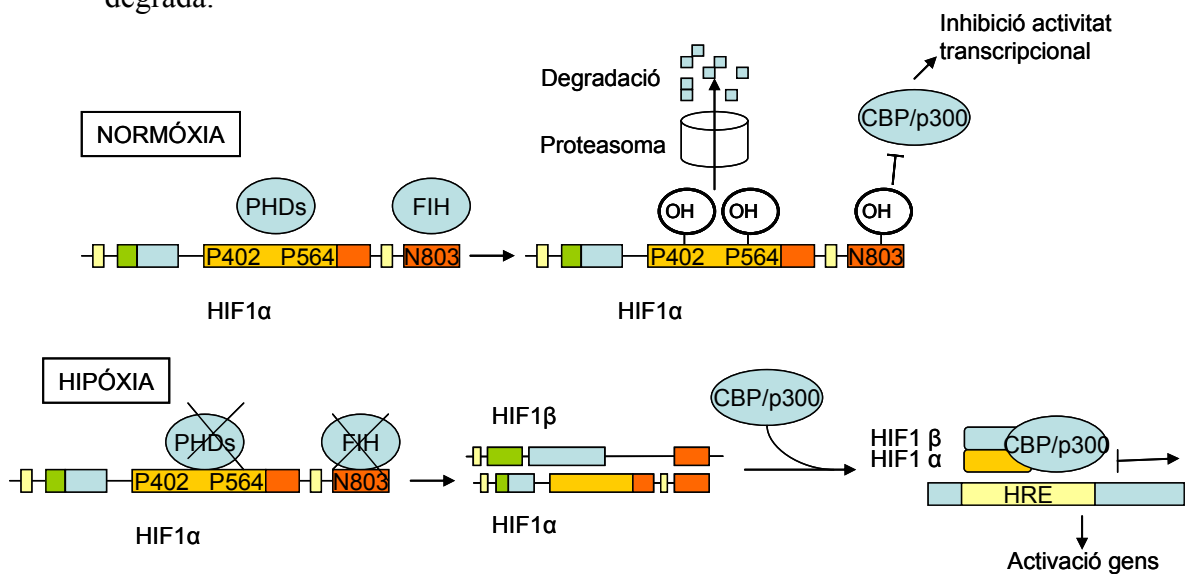


Fig. 9. Acció de les PHDs i FIH sobre la subunitat α en condicions de normòxia i hipòxia

En els dos casos els enzims són dioxigenases, enzims dependents de Ferro que usen l'oxigen molecular per a hidroxilar el substrat principal, vinculant-ho a la modificació del cosubstrat, en aquest cas alfa-cetoglutarat. Són una família molt extesa i catalitzen un gran rang de reaccions oxidatives, incloent hidroxilacions, desnaturalitzacions i tancament d'anells. Estàn implicades en molts processos: detecció d'oxigen, reparació DNA, remodelació de la cromatina, efectes en la formació del col·lagen, i efectes en metabolisme lipídics, diabetis i obesitat (Boulahbel et al., 2009; Webb et al., 2009). S'inactiven en condicions de falta de substrat o cosubstrat, falta d'oxigen, ferro o excés de producte. La Km de FIH per a l'oxigen és menor que la de les PHDs, de manera que a mesura que disminueix la concentració d'oxigen s'inactiven primer les PHDs i posteriorment la FIH (Dayan et al., 2006; Koivunen et al., 2007). D'aquesta manera encara que part de la subunitat α s'escapi de la degradació el sistema assegura HIF només s'activa en condicions estrictes de falta d'oxigen, demostrant ésser un sistema molt sensible i complex. Sembla que HIF2 α és més resistent a l'activitat de FIH que HIF1 α . (Lando et al., 2002a; Lando et al., 2002b; Peet and Linke, 2006).

L'activitat de les hidroxilases és la màxima regulació de l'activitat del factor. El descobriment dels enzims hidroxilases de HIF ha permés realitzar una connexió clara entre l'oxigen molecular i la resposta cel·lular a hipòxia. Les PHD i FIH actúen com a sensors d'oxigen intracel·lular, tant per situacions d'hipòxia, com efectes indirectes deguts a un redireccionament cel·lular o canvis en la funció mitocondrial.

La via principal de degradació de la subunitat α en condicions de normòxia és la via que inclou la hidroxilació per PHDs i la degradació per la via ubiquitina-proteasoma, generalment implicant la proteïna von Hippel-Lindau (VHL). Paral·lelament s'han descrit moltes proteïnes que interaccionen amb HIF1 α i n'indueixen estabilitat o degradació (com candidats a gens supressors de tumors (Ozer et al., 2005) o RACK1 (Receptor de la proteïna kinasa C activada)). RACK1 promou la degradació via ub-proteasoma independent de VHL, que sembla complementària i explicaria la variada expressió de HIF1 α en diferents teixits (Liu and Semenza, 2007). Un altre cas és p53, que interacciona amb HIF1 α per la regió ODDD d'aquest i s'hipotetitza si l'apoptosi dependent de p53 involucra aquesta interacció (Sanchez-Puig et al., 2005).

Aquest treball es centra en l'estudi de les PHDs i exclou l'estudi de FIH, per avaluar el sistema de degradació de HIF1 α en normòxia ja que es descriu una correlació

entre la presència de la proteïna HIF1 α i l'activitat del factor i una alteració en l'estabilitat de la proteïna HIF1 α .

2.6.2. Sistema principal de degradació de la subunitat α dependent d'oxigen: PHDs-VHL-proteasoma

La regulació de l'expressió de la subunitat alfa en normòxia ve determinada per l'acció conjunta i consecutiva de les prolihidroxilases i el sistema ubiquitina-proteasoma. La subunitat HIF1 α és constantment sintetitzada però en presència d'oxigen les PHDs hidroxilen uns residus Prolina concrets que permeten que HIF1 α sigui reconeguda per la proteïna Von Hippel Lindau (VHLp), que forma part del complex E3 lligasa d'ubiquitines, i s'uneixin varies ubiquitines (ub) a HIF1 α , marcant-la per a la seva posterior degradació al proteasoma (Epstein et al., 2001; Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999).

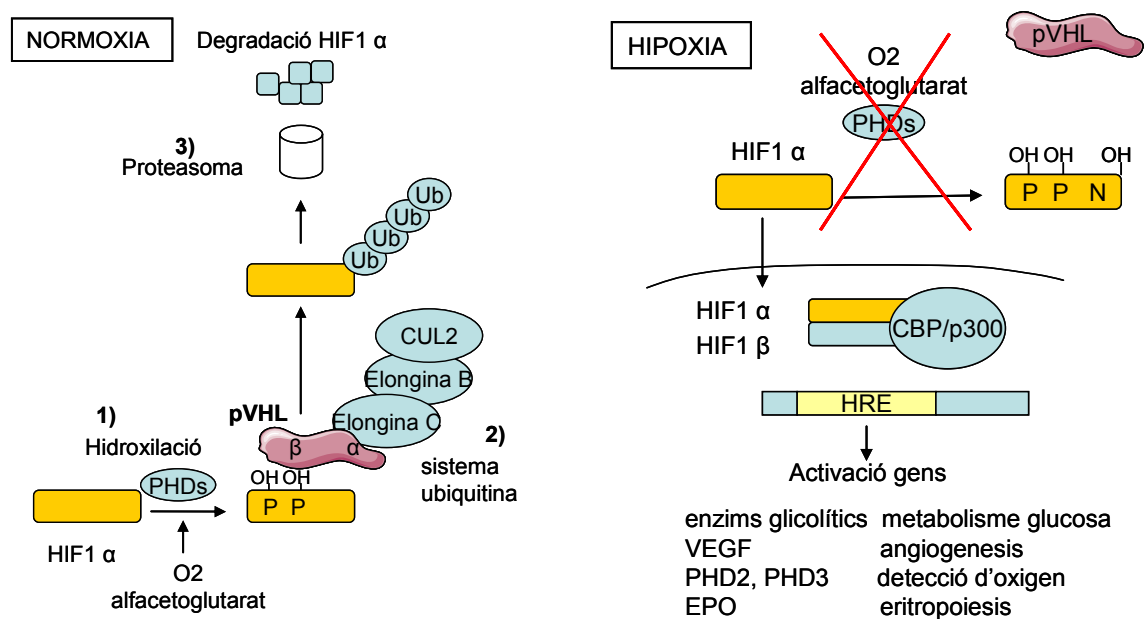


Fig. 10. Sistema de degradació dependent d'oxigen de la subunitat α en condicions de normòxia i hipòxia.

En condicions d'hipòxia els mecanismes d'hidroxilació no funcionen, la subunitat no es degrada, és transportada al nucli i pot formar l'heterodímer actiu. La inducció de la subunitat α en situacions d'hipòxia és molt ràpida, als 5 min. d'iniciar la hipòxia/anòxia (Jewell et al., 2001). La clau d'aquesta rapidesa es basa que no consisteix en la inducció de la proteïna, sinó en la inhibició de la seva degradació. En la reoxigenació la degradació és també molt ràpida, HIF α desapareix del nucli en qüestió

de minuts durant la reoxigenació després d'hipòxia (Fandrey et al., 2006; Huang et al., 1996). Alteracions en el sistema d'hidroxilació o d'ubiquitinització-degradació poden donar elevats nivells de HIF α i activació del factor de transcripció i de la seva resposta en situacions de normòxia fet que es coneix com *pseudohipòxia*.

2.6.2.1.PHDs: Hidroxilació en prolina

Les prolina-hidroxilases hidroxilen uns residus Prolina concrets (Pro402, Pro564 en HIF1 α humà) del domini de regulació per oxigen (*ODDD*) localitzat a Cterminal del domini PAS de la subunitat HIF α (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001), determinant la seva degradació pel proteasoma. Les PHDs són molt més que sensors d'oxigen, donada la complexitat de la seva la reacció, vinculen la detecció d'hipòxia a detecció d'alteracions en el metabolisme cel·lular.

Les PHDs van ser descrites inicialment a *C. elegans* (només una HIF-hidroxilasa:Egl9) (Epstein et al., 2001) i posteriorment en mamífers, on la família PHD (també anomenada *HIF Prolyl Hydroxylases*, HPH) consta de tres membres de zona catalítica conservada (Cterminal): PHD1 (HPH3), PHD2 (HPH2), PHD3 (HPH1) (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001).

La distribució de les PHDs varia, PHD1 es troba principalment en testicles, PHD3 en múscul llis i cardíac, mentre PHD2 és constitutiva(Appelhoff et al., 2004; Willam et al., 2006). La seva distribució intracel·lular també és diferent; PHD1 és nuclear i d'import clàssic dependent d'importines $\alpha\beta$, PHD2 principalment citoplasmàtica, i PHD3 es s'ubica en ambós compartiments (Metzen et al., 2003a; Steinhoff et al., 2009). S'ha descrit que PHD2 es desplaça entre nucli i citoplasma per via independent d'importines (Steinhoff et al., 2009).

La hipòxia indueix PHD2 i PHD3 creant un efecte de feedback negatiu però no altera l'expressió de PHD1 (Berra et al., 2003; Epstein et al., 2001; Metzen et al., 2003a) PHD2 és diana de HIF1 α mentre PHD3 ho és de HIF1 α i HIF2 α (Aprelikova et al., 2004). PHD1 és regulada per estrògens, PHD3 per p53, falta del factor NGF(*nerve growth factor*) entre altres(Schofield and Ratcliffe, 2004). En la reoxigenació és l'activitat deguda a PHD2 i PHD3 la que degrada HIF1 α (Appelhoff et al., 2004). PHD2 és la més abundant en normòxia mentre l'expressió de PHD3 és molt menor, no obstant la hipòxia indueix proporcionalment més PHD3 que PHD2 i PHD2 sembla més restrictiva a la falta d'oxigen. Estudis de siRNA han permès determinar que PHD2 té més influència sobre HIF1 α mentre PHD3 sobre HIF2 α . Això pot ser degut a les

diferències del domini de regulació per oxigen, PHD3 té preferència per la zona Cterminal indistintament de HIF1 α que 2 α , mentre PHD2 té preferència per Nterminal de HIF1 α (Appelhoff et al., 2004; Webb et al., 2009). PHD2 es considera que té un paper dominant en el control dels nivells de HIF1 α en normòxia (Berra et al., 2003). Els dos residus Prolines de la subunitat α s'inclouen en una seqüència conservada LXXLAP (X és un a.a. qualsevol) on es toleren certes mutacions dels a.a. que no són la pròpia Prolina, i PHD2 té la màxima activitat específica per seqüència primària (Huang et al., 2002).

La taxa de recanvi proteic és molt alta per a les PHDs (Schofield and Ratcliffe, 2004). Són degradades per ubiquitinització (Habelhah et al., 2004; Nakayama et al., 2004). Siah1a/2 són proteïnes E3 ubiquitina lligases que interaccionen amb PHD1 i 3. En cèl·lules i ratolins deficients de Siah s'expressa PHD3 constitutivament i la inducció de HIF és menor, alhora HIF regula Siah. En el cas de PHD2, també està regulada per una cis/trans isomerasa independent d'hipòxia (Barth et al., 2007).

Els models de ratolins *knock out* aporten informació funcional de les PHDs: PHD2 és necessària pel desenvolupament embrionari ja que PHD2^{-/-} moren a l'úter, i mostra formació aberrant de la placenta, però PHD2^{-/+} sobreviuen amb un desenvolupament aparentment correcte (Takeda et al., 2006). Ratolins PHD2 ^{-/-} induïbles postnatalment presenten una major vascularització i més VEGF (Takeda et al., 2008; Takeda et al., 2007) i policitemia com les mutacions en l'home (Minamishima et al., 2008). PHD1^{-/-} presenten major tolerància a la hipòxia en múscul esquelètic i increment de l'expressió de HIF2 α (Aragones et al., 2008). Ratolins PHD3^{-/-} mostren un increment del tamany dels ganglis cervicals que altera el sistema simpatico-adrenal i disfunció cardíaca (Aragones et al., 2008; Bishop et al., 2008; Minamishima et al., 2008).

Reacció d'hidroxilació

La reacció d'hidroxilació requereix alfaetoglutarat (KG) com a cosubstrat, i FeII i oxigen com a cofactors. En aquesta reacció les PHDs insereixen un àtom d'oxigen al substrat i l'altre àtom reacciona amb alfaetoglutarat produïnt Succinat i CO₂ (Boulahbel et al., 2009); McDonough et al., 2006)). Les PHDs primer interaccionen amb alfaetoglutarat, formant un complex i després amb HIF α . S'ha descrit l'estructura cristal·logràfica de l'interacció del domini catalític de PHD2 amb Ferro i un inhibidor (McDonough et al., 2006) i també del domini catalític de PHD2 amb el domini ODDD de HIF1 α (Bruick and McKnight, 2001; Chowdhury et al., 2009). PHD2 presenta un

canvi conformacional molt gran i una elevada estabilitat del complex intermig PHD2-Fe(II)-KG. L'estructura flexible de PHD2 permet tenir una conformació oberta per a l'entrada del substrat (McDonough et al., 2006).

Donada la dependència de les PHDs per alfaacetoglutarat i ferro, actualment, no només es considera l'oxigen com a regulador de HIF α i es descriuen les PHDs com a sensors del metabolisme cel·lular general (en relació a l'aport i demanda d'oxigen, equilibri de Fe, energia) (Boulahbel et al., 2009).

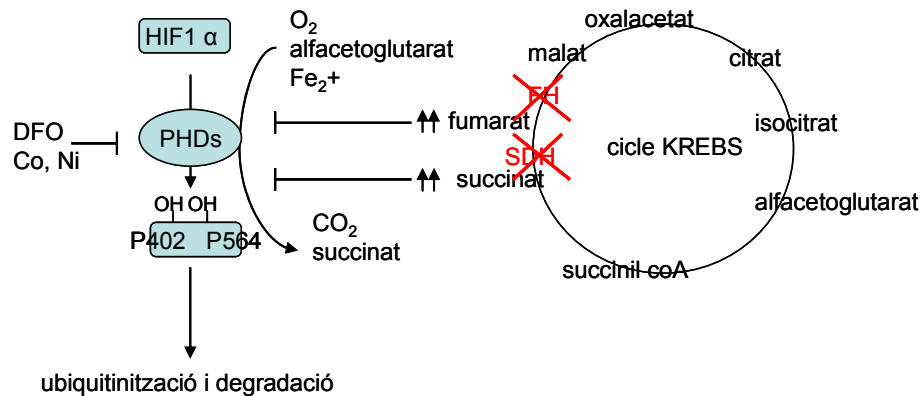


Fig11. Reacció d'hidroxilació per PHDs i factors reguladors de la reacció. FH: fumarat hidratasa, SDH: Succinat Deshidrogenasa, DFO: Deferroxamina

La reacció d'hidroxilació de les PHDs és reversible, i la regulació de l'activitat depèn dels nivells i la qualitat de l'enzim i dels factors de la reacció. La falta de cosubstrat o cofactors, o l'excés de producte poden inhibir la reacció en condicions de normòxia i ser una causa del fenomen de *pseudohipòxia*.

- Oxigen:

L'oxigen és el principal factor limitant de la reacció (la Km de PHD2 és major per a l'oxigen que per KG i per HIF1 α (Ehrismann et al., 2007; Hirsila et al., 2003)). La combinació d'enzim i substrat interacciona amb l'oxigen molecular. La inhibició de les PHDs és condicionada a la severitat de la hipòxia, una hipòxia lleu permet la redistribució de l'oxigen intracel·lular desde la mitocondria a PHD (Wenger et al., 2005). Situacions que impliquen una distribució diferent de l'oxigen dins la cèl·lula o que aquest estigui acomplexat indueixen la inhibició de les PHDs.

- Ferro:

Les PHDs són dioxigenases que coordinen el ferro directament amb la proteïna. Requereixen de Ferro (II) (Schofield and Ratcliffe, 2004);Gerald et al., 2004;Peyssonnaud et al., 2007), i per tant són inhibides per quelants de ferro com la

deferroxamina, (DFO) i metalls (com Co(II), Ni(II), i Mn(II)) que desplacen el Fe, i indueixen HIF (Bruick and McKnight, 2001; Jaakkola et al., 2001). La depleció de Fe en el cultiu *in vitro* indueix l'expressió de HIF α no hidroxilat i es reverteix en afegir Fe al cultiu. La toxicitat per Alumini (és prooxidant i interfereix en el metabolisme del Ferro) indueix la translocació de HIF1 α al nucli (Mailloux and Appanna, 2007). L'estrés oxidatiu cel·lular induït per exemple per H₂O₂ també inhibeix les PHDs perquè es redueix la disposició de Fe(II) (Gerald et al., 2004)

- Ascorbat

L'ascorbat sembla que estimula l'acció de les PHD, però el mecanisme no està clar, sembla que facilita la presència de Ferro per a la hidroxilació (Fe²⁺). Afegir ascorbat redueix l'acumulació de HIF1 α en normòxia *in vitro* en cèl·lules tumorals. (Knowles et al., 2003). La hidroxilació s'inhibeix en casos de patologies que impliquen falta d'ascorbat (Kivirikko and Pihlajaniemi, 1998; Webb et al., 2009).

- Oxid nítric (NO)

L'òxid nítric s'indueix en situacions d'hipòxia. Inhibeix l'activitat PHD (Metzen et al., 2003) i estabilitza HIF1 α en condicions de normòxia (Wenger et al., 2005). Una hipòtesis és que inhibeix la respiració mitocondrial i així es redistribueix l'oxigen de la mitocondria als sensors de oxigen PHD (Hagen et al., 2003).

- Metabòlits intermediaris del cicle de l'àcid cítric.

La necessitat d'alfacetoglutarat (metabòlit intermediari del cicle de Krebs) com a cosubstrat en la reacció fa pensar en l'acoblament dels senyals metabòlics i hipòxics, ja que si es donés una situació de poca disponibilitat d'aquests metabòlits en un compartiment intracel·lular el resultat seria l'activació de la via.

Existeixen patologies canceroses hereditaries que han permès l'estudi de la rellevància d'intermediaris del cicle de l'àcid cítric en la reacció (King et al, 2006). És el cas de defectes en alguna subunitat de l'enzim **succinat deshidrogenasa (SDH)** (subunitats SDHB, SDHC, SDHD) i defectes en l'enzim **fumarat hidratasa(FH)**, que s'associa entre d'altres a carcinoma renal. En aquestes patologies, la falta de funcionalitat de l'enzim condueix a l'acumulació de succinat i fumarat respectivament, que actuen com a inhibidors de l'hidroxilació de HIF α i s'estabilitzen els nivells en normòxia (*pseudohipòxia*). FH i SDH són proteïnes mitocondrials que intervenen en el TCA, i també són conegudes com a supressors de tumors. SDH intervé en la fosforil·lació oxidativa ja que forma el complex II de la cadena de transport d'electrons.

Es contemplan dues hipòtesis per a l'estabilització de HIF1 α donades aquestes mutacions. La primera és que l'alteració de SDH condueixi a l'alteració del complex i es formin ROS que inhibeixen les PHDs (Gerald et al., 2004; Messner and Imlay, 2002; Yankovskaya et al., 2003) però la presència de ROS no sembla indispensable per a la pseudohipòxia (Selak et al., 2006). La segona hipòtesis, més recent, implica que el succinat i el fumarat actuin com a inhibidors directes de PHDs (Selak et al., 2005). El succinat s'acumula en cèl·lules amb disfunció en SDH, i es mou lliurement entre el mitocondri i el citosol inhibint les PHDs per inhibició per producte de manera dosis dependent (Selak et al., 2005). En el cas de fumarat, existeix una relació entre la deficiència de FH i l'activació de HIF en tumors RHLRCC (Isaacs et al., 2005).

Estudis estructurals *in vitro* han descrit que fumarat i succinat interaccionen amb FIH de la mateixa manera però no l'inhibeixen. Fumarat, succinat i oxalacetat inhibeixen PHD1-3, mentre citrat inhibeix FIH. Fumarat i succinat s'han descrit com a inhibidors de PHD2 en normòxia, determinant que és una inhibició oxigen dependent i per competició amb KG però no amb el substrat principal. El Fumarat s'acumula i inhibeix les PHDs per semblança química amb succinat. El fumarat és un inhibidor més potent, que té una estructura més rígida i interacciona millor amb les PHDs. (Baysal et al., 2000; Isaacs et al., 2005; Hewitson et al., 2007; Koivunen et al., 2007). L'adició d'altres metabòlits relacionats com són piruvat i oxalacetat indueix l'expressió de HIF1 α (Dalgard et al., 2004)

S'ha demostrat que aquesta inhibició és competitiva i pot ser revertida elevant farmacològicament els nivells d'alfacetoglutarat (KG). Incrementar el KG intracel·lular aconsegueix restablir l'activitat basal de PDH, i disminuir els nivells de HIF1 α , per degradació ubiquitina-proteasoma (MacKenzie et al., 2007). Productes inhibidors de les PHDs són antagònics a KG. L'alteració de l'homeostasis de KG per toxicitat per alumini indueix l'inactivació de PHD2 i l'acumulació nuclear de HIF1 α , fenòmens reversibles amb l'adició de KG (Mailloux et al., 2009). L'adició de derivats de KG manté lleugerament l'activitat PHD en hipòxia i pot ser una estratègia per a la teràpia antitumoral. (Tennant et al., 2009)

2.6.2.2. Ubiquitinització i degradació

El sistema de degradació dependent d'ubiquitina-proteasoma (*Ubiquitin-proteasome system*: UPS) és el responsable del recanvi de moltes proteïnes cel·lulars. Existeixen dos sistemes principals de degradació proteica en eucariotes: el sistema

lisosomal, que juga un paper minoritari, i el sistema UPS, que s'encarrega de la major part de les proteïnes cel·lulars.

L'alteració o inhibició del proteasoma es vincula a moltes patologies. La desregulació del sistema ubiquitina-proteasoma, ja sigui per l'alteració del sistema o la mutació de les proteïnes diana, es relaciona amb processos tumorals i neuropatologies, com és el cas de Parkinson o malalties priòniques (Hershko and Ciechanover, 1998; Lehman, 2009). L'UPS és un sistema complex que requereix ATP, de regulació fina i especificitat de substrat, present al citosol i al nucli, que aporta un processament més complet produïnt pèptids molt petits.

Els estudis amb inhibidors de baix pes molecular del proteasoma han permès determinar la gran varietat de proteïnes regulades per aquest sistema. (Lee and Goldberg, 1998):

- Principalment és el sistema de depuració de proteïnes no útils per a la cèl·lula (proteïnes oxidades, acumulades en excés, mutants o mal plegades)
- controla l'expressió de sistemes de senyalització, de comunicació cèl·lula-cèl·lula, de proteïnes implicades en el desenvolupament, la diferenciació, el cicle cel·lular, els ritmes circadians, l'apoptosi.
- el sistema immune i presentació de l'antigen.
- en alguns casos també activa proteïnes per processament parcial
- S'encarrega indistintament de proteïnes de vida mitja llarga o curta, tots casos en què és important el patró temporal d'expressió. (Lehman, 2009)

Funcionament del sistema UPS:

El sistema UPS inclou una part més clàssica d'activitat proteolítica i una més perfeccionada d'ubiquitinització (Finley, 2009). És un procés complex i seqüencial:

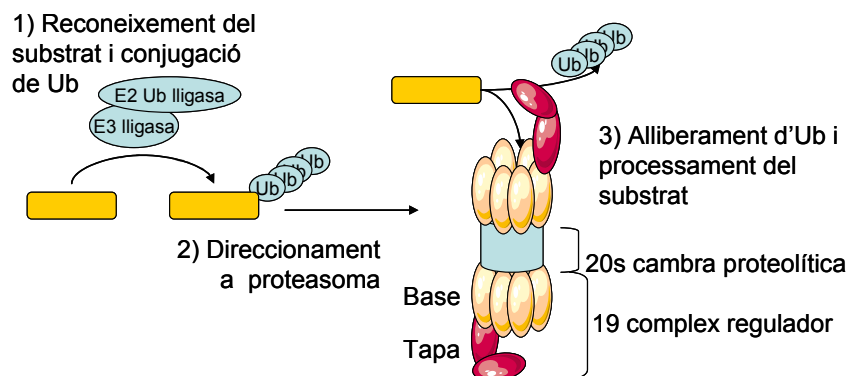


Fig12. Esquema del sistema de ubiquitinització i degradació pel proteasoma basat en (Crews, 2003) amb modificacions.

1. Reconeixement i ubiquitinització de la proteïna diana

El procés d'ubiquitinització uneix covalentment ubiquitines(ub) (proteïna petita, de 76 a.a.8.5kD) a lisines de la proteïna diana a través d'un enllaç peptídic. En molts casos, s'afegeixen més monòmers a la primera ubiquitina fomant una cadena poliubiquitinada. Aquest procés és un procés que inclou molts passos i és altament regulat per proteïnes de funcions diferents. L'activació de les ubiquitines i unió a proteïna diana és catalitzat per un complex enzimàtic d'activitat seqüencial:

- E1: enzim d'activació de l'ubiquitina
- E2:enzim de conjugació de la ubiquitina
- E3:enzim de lligació de la ubiquitina

L'activació de la ubiquitina és un procés depenent d'ATP. La ub es transfereix a E2. La E3 lligasa reconeix la proteïna diana específica (modificada, freqüentment per fosforil·ladació, hidroxilació o glicosilació) i forma un pont isopeptídic entre la proteïna diana i la ubiquitina. L'activitat E1 no és específica, només es coneixen dues isoformes de la proteïna en mamífers (Cook and Chock, 1992). L'especificitat de la reacció d'ubiquitinització ve determinada per la subunitat E3, que actúa sobre un substrat específic, o algunes proteïnes de seqüència comú. Existeixen moltes E3 putatives, i són les combinacions entre E2/E3 que generen especificitat (Lehman, 2009) La regulació de E3 lligasa és per fosforil·lació, i també pot regular-se depenent de la distribució subcel·lular. L'activitat E4 recentment descrita conjuga ub addicionals per formar la cadena de poliubiquitinització(Koegl et al., 1999)

Sistema d'ubiquitina per a HIF

En el cas de HIF, la proteïna supressora de tumors von Hippel-Lindau (pVHL) és el component de reconeixement del complex E3 lligasa (Iwai et al., 1999; Lisztwan et al., 1999) que interacciona específicament amb HIF1 α (Cockman et al., 2000) hidroxilat prèviament per les PHDs (Jaakkola et al., 2001).. VHLp interacciona amb HIF alfa induïnt la ubiquitinització (Cockman et al., 2000; Kamura et al., 2000; Ohh et al., 2000; Tanimoto et al., 2000). Aquesta interacció és oxigen depenent, perquè es relaciona amb activitat prolilhidoxilasa (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001).

El complex proteic VHLp-elonginaC-elioginaB-culina2-Rbx té activitat E3 lligasa, i VHLp és la subunitat de reconeixement (Iwai et al., 1999; Lisztwan et al., 1999). pVHL va ser descrita com a gen responsable de la malaltia hereditaria de von

Hippel-Lindau (Bratslavsky et al., 2007; Latif et al., 1993). Aquest és l'exemple més directe de la desregulació negativa del sistema UPS: VHLp es troba mutat en la línia germinal en la malaltia hereditària VHL. En aquesta malaltia, ja sigui per delecció o per mal funcionament de la proteïna VHL, HIF1 α no s'ubiquitinitza ni degrada i es sobreexpressa, induïnt tumors vascularitzats d'elevats nivells de VEGF, entre ells carcinoma renal. També és molt freqüent la delecció de pVHL en els tumors renals espontanis (Latif et al., 1993; (Kaelin, 2002). Estudis realitzats amb cèl·lules de carcinoma renal deficientes en VHL (Cockman et al., 2000; Maxwell et al., 1999; Ohh et al., 2000) han indicat la regulació de HIF α per VHL i han permès descriure els dominis d'interacció de VHLp amb HIF α en un domini freqüentment mutat. En cèl·lules deficientes de VHL HIF α està estabilitzat, però si es recupera la funcionalitat de VHL, s'indueix la ubiquitinització i la regulació per oxigen. L'estudi d'aquestes patologies ha permès determinar el sistema de regulació de la subunitat HIF α pel sistema ubiquitin-proteasoma, alhora que determinar el paper de la via de resposta a hipòxia i la importància de la hidroxilació.

La descripció de l'estructura del complex VHL, elonginaB, elongina C (Stebbins et al., 1999), ha permès determinar dos dominis freqüentment mutats: el domini α , que interacciona amb elongina C i el domini β per la unió al substrat (HIF1 α)(Ohh et al., 2000), alhora que s'ha descrit la unió en dues interfases: elongina C amb VHL i elongina C i B. Tant la seqüència primària com l'estructura del complex s'assemblen a la d'un complex d'activitat ubiquitin lligasa en llevats (complexSCF: Skp1-Cul1-Fbox protein) (Kaelin, 2002). Estudis estructurals han implicat la formació de ponts d'hidrogen entre el grup hidroxil de la Prolina hidroxilada de HIF1 α i el domini β de VHL(Bruick and McKnight, 2001; Jaakkola et al., 2001), sembla que VHL té una única butxaca en la zona hidrofòbica que reconeix específicament Prolina hidroxilada.(Hon et al., 2002; Min et al., 2002)

2. Reclutament al proteasoma, translocació

El complex 26S proteasoma es troba al nucli i al citoplasma de les cèl·lules de mamífer i està format per una subunitat central 20s i i dues subunitats 19S, formant una estructura en barril. La proteïna diana poliubiquitinada és transferida depenent de ATP al complex proteasa 26S proteasoma per les proteïnes receptores de ub, que reconeixen les ubiquitines de la proteïna diana i la subunitat 19S del proteasoma (Buchberger, 2002; Kang et al., 2006)

3. Desubiquitinació, despleament i proteolisis

La desubiquitinació i el despleament de la proteïna diana són imprescindibles per a l'entrada a la subunitat central 20S on serà degradada. (Crews, 2003). Els enzims desubiquitinadors alliberen els monomers de ub per a poder ser reutilitzats. (Hershko and Ciechanover, 1998; Lehman, 2009).

L'estructura del complex de proteasoma coincideix amb la distribució funcional:

- subunitat reguladora: està formada per la tapa i la base. La base conté ATPases, proteïnes de reconeixement de ubiquitines i de despleament de la proteïna. La tapa conté proteïnes desubiquitinadores.
- subunitat catalítica: És una estructura en forma de barril formada per 4 anells heptamèrics. Les 3 subunitats catalítiques es troben al part interna, amb activitats caspasa, tripsina i quimiotsipsina. Aquesta sembla la limitant i sobre la que actuen els inhibidors anàlegs de substrat (Lee and Goldberg, 1998).

La proteïna ubiquitinada és reconeguda per la subunitat reguladora, desplegada i translocada a la part interna del core usant ATP, on serà processada. Existeixen altres proteïnes que s'associen al proteasoma i col·laboren en funcions no catalítiques i aporten complexitat i especificitat al proteasoma (Finley, 2009)

2.6.3. Mecanisme d'acció de HIF

Import al nucli, heterodimerització i transactivació.

En relació a HIF ha estat molt estudiada la seva regulació i estabilització però menys el transport nuclear (Depping et al., 2008; Kallio et al., 1998; Luo and Shibuya, 2001). HIF α s'importa per la via d'importina α/β , el sistema de transport de proteïnes grans (>40-60 kDa) al nucli: l'importina α reconeix una seqüència en la proteïna diana ("*nuclear localization sequence*" NLS) i s'uneix a l'importina β que media les interaccions amb el complex nuclear del porus (Lange et al., 2007). Es coneixen dues regions NLS en HIF1 α , una Cterminal i una Nterminal. La subunitat α no necessita heterodimeritzar-se per ser importada al nucli (Chilov et al., 1999 (Kallio et al., 1998). HIF1 α i HIF1 β (ARNT) interaccionen directament amb importina α , però no interaccionen directament amb la β . En canvi HIF2 α (EPAS) interacciona directament amb importina β . Sembla que la interacció amb importina α és per la zona Ct de NLS de HIF1 α , ja que mutacions d'aquest i no de Nt NLS inhibeixen totalment el transport a nucli i la interacció amb importina α . Sembla que HIF α 1 i 2 interaccionen amb

importines 1,3,4, 5,7 (Depping et al., 2008) (Chachami et al., 2009). HIF1 α també pot sortir del nucli en ser fosforil·lats residus propers a una seqüència d'export "Nuclear export signal", NES. (Mylonis et al., 2006)

Ambues subunitats (α i β) contenen un domini comú anomenat "helix loop helix-PAS" (bHLH-Pas) La dimerització entre la subunitat α i la β es dona per interaccions entre HLH i PAS(PAS:acrònim PER, ARNT, SIM, les primeres proteïnes descobertes que contenen aquest domini d'unió al DNA). HLHb és domini d'interacció amb el DNA, en seqüències específiques.

La subunitat α conté dos dominis transactivadors: el domini Nterminal (N TransActivation Domain: NTAD) i el domini Cterminal (CTAD). NTAD es solapa amb la regió ODDD, que en condicions de normòxia interacciona amb el complex d'ubiquitinització i per tant no pot interaccionar amb el DNA. El domini CTAD està aïllat, però no activa la transactivació perquè FIH hidroxila un residu Asn, evitant la unió de coactivadors (P300 i CBP (cyclic-AMP-response-element-binding protein(CREB) binding protein)). El domini Ct pot ser inhibit per FIH però el Nt no. Així doncs, la funció transcripcional és molt variada: segons si implica NTAD o CTAD o ambdues (Dayan et al., 2006). Això fa pensar que HIF1 i 2 poden actuar cooperativament (Gordan and Simon, 2007; Ratcliffe, 2007).

En situació d'hipòxia l'heterodímer dimeritzat s'uneix a una zona consens del DNA anomenada HRE (*hypoxia responsive element*) present al promotor o regions reguladores de gens diana de HIF. La seqüència consens és 5'RCGTG3' (on R pot ser una A 75% o G 25%) (Pugh et al., 1991; Semenza et al., 1991; Wenger et al., 2005), la part central és el "mínim domini DNA" requerit per a la interacció amb HIF (CORE HRE) i és necessari però no suficient. Un HRE plenament funcional conté a més zones pròximes cis per la unió amb cofactors, que donen amplificació o especificitat de teixit a la resposta a hipòxia. Un HRE funcional també pot ser el producte de COREs posats en tandem (com el gen de la transferrina, certs enzims glicolítics i Glut1) (Wenger et al., 2005)

Si HIF1 i 2 distingeixen entre gens diana és encara una qüestió no resolta. L'exemple més clar és la eritropoietina, que inicialment es creia era regulada per HIF1 α mentre ara es sap que és HIF2 α . El més probable és que depengui de la cooperació de cofactors i expressió específica de teixit ja que no sembla haver-hi diferències en el CORE dels diferents gens(Wenger et al., 2005). Sembla que les dues subunitats no tenen funcions redundants. No sembla que existeixin gens diana específics per a HIF2 α .

La hipòtesis més comú és que depenen de l'expressió de la proteïna, que ve determinat pel tipus cel·lular i el patró d'inducció, que sembla ser diferent en cas de HIF1 i 2, ja que en HIF1 sembla induir-se ràpidament i principalment en hipòxies severes mentre HIF2 és d'expressió mantinguda en concentracions d'oxigen menys restrictives i de períodes llargs.

2.6.4. Resposta d'adaptació a hipòxia

HIF va ser originàriament descobert com a un factor de transcripció que interaccionava en condicions d'hipòxia amb el gen de l'eritropoietina (Semenza, 1992), hormona de creixement hematopoietic que s'allibera en resposta a la disminució de la concentració sanguínea d'oxigen en casos com anèmia o altitud. (Semenza, 1999; Wang and Semenza, 1995).

Metabolisme energètic	
Transportador de glucosa1(Glut1)	Gliceraldehid 3 fosfat deshidrogenasa (GAPDH)
Hexoquinasa I (HKI)	Aldolasa
Hexoquinasa II (HKII)	Enolasa 1
Fosfofructoquinasa/bifosfatasa(PFKBF3)	Fosfoglicerat quinasa 1(PGK1)
Gliceraldehid fosfat deshidrogenasa	Lactat deshidrogenasa A(LDH A)
Piruvat quina (PK)	Anhidrasa carbònica
Angiogènesis	
VEGF A (vascular endotelial growth factor A)	
RcVEGF (receptor de VEGF A)	
Eritropoiesis	
Eritropoietina (EPO)	
Metabolisme del ferro	
transferrina	
Receptor de la transferrina	
Regulació del pH	
Anhidrasa carbònica	
Proliferació i supervivència cel·lular	
Apoptosi	

Fig13. Algunes de les funcions i dels gens induïts per HIF1.

A partir de la descripció de l'eritropoietina com a diana de HIF, es van determinar HRE en altres gens: enzims glicolítics (fosfoglicerat-quinasa1 i lactat deshidrogenasa) transportadors de glucosa, enzims de la gluconeogènesis, entre d'altres. Actualment s'han descrit molts gens activats per HIF1 (2-5% del genoma), ja sigui directa o indirectament en resposta a hipòxia en humans (Lisy, Peet. 2008). Activa gens d'adaptació metabòlica (incrementant la taxa de la glicòlisis, equilibrant el pH), d'increment de l'aport d'oxigen al teixit (eritropoesis, angiogenesis i to vascular), intervé en el creixement i diferenciació, supervivència, apoptosi i autofagia (Semenza, 2003). Es coneix un mecanisme de regulació negativa, ja que HIF1 activa gens que directa o indirectament atenuen la resposta a hipòxia, com és l'activació de les PHDs, o la inducció de HIF3 α (Thrash-Bingham and Tartof, 1999).

En normòxia, la principal via d'obtenció d'energia és el procés de glicòlisis per a l'obtenció del piruvat, entrada al cicle de l'àcid tricarboxílic mitocondrial (TCA) i la fosforil·lació oxidativa (OXPHOS). Aquest procés és molt eficient, però depèn d'oxigen i resulta en ATP, CO₂ i aigua. Les cèl·lules deprivades d'oxigen utilitzen el pas de piruvat a lactat per regenerar el NAD⁺, menys eficient. HIF és el principal responsable de les respostes adaptatives del metabolisme durant la hipòxia. HIF1 induïx:

- Increment del flux glicolític a diferents nivells. HIF1 incrementa la captació de glucosa induïnt l'expressió del transportador Glut1. HIF1 incrementa la taxa glicolítica induïnt enzims clau com HKII (hexoquinasa II), PGK (fosfoglicerat quinasa). La fosfofructoquinasa 1 (PFK1) catalitza la conversió de fructosa 6P a fructosa 1,6 bifosfat. La fructosa 2,6 bifosfat (Fru-2,6-P₂) actua com a activador al·lostèric, i és el producte de l'activitat enzimàtica dual quinasa/fosfatasa dels enzims 6fosfofructo2quinases/fructosa2,6-bifosfatasa (PFKFB). HIF1 induïx PFKFB3 (Minchenko et al., 2003; Minchenko et al., 2005; Obach et al., 2004) ja que aquest gen té present un HRE al seu promotor (Obach et al., 2004).
- HIF1 regula la respiració mitocondrial per tal d'evitar l'increment de radicals d'oxigen al mitocondri. Per tal d'incrementar l'eficiència de la cadena de transport d'electrons en condicions d'hipòxia, HIF induïx la subunitat més eficient de la citocrom c Oxidasa (COX4-2) i activa una proteasa que degrada la subunitat menys eficient. S'observa que en cèl·lules renals deficientes de VHL el metabolisme mitocondrial està més reduït (Fukuba et al., 2007).

- HIF1 redirecciona l'ús de piruvat: evita la via oxidativa que implica acetilCoA i prioritza la conversió de piruvat a lactat, atenuant la respiració mitocondrial i la seva producció de radicals lliures. HIF1 indueix la Piruvat deshidrogenasa quinasa (PDK1), que inhibeix per fosforil·lació l'activitat Piruvat Deshidrogenasa (PD) (catalitza pas de Piruvat a AcetiCoA) (Kim et al., 2007; Kim et al., 2006a; Papandreou et al., 2006). Es redueix el processament de piruvat pel cicle TCA i aquest s'acumula, metabolitzant-se a lactat per la Lactat deshidrogenasa (LDH). El lactat s'allibera a l'espai extracel·lular.
- L'increment del metabolisme glicolític al citosol implica un increment de la concentració d'àcid làctic. HIF1 està implicat en la regulació del pH intracel·lular per diferents mecanismes: expulsió de l'àcid lactic fóra del citoplasma per inducció d'un cotransportador H⁺/lactat (Ullah et al., 2006); expulsió dels ions H⁺ del citoplasma per inducció d'un intercanviador citoplasmàtic (Shimoda et al., 2006); alcalinització/tamponament del citoplasma per increment de les anhidrases carbòniques de la membrana cel·lular, que converteixen CO₂ en àcid carbònic.

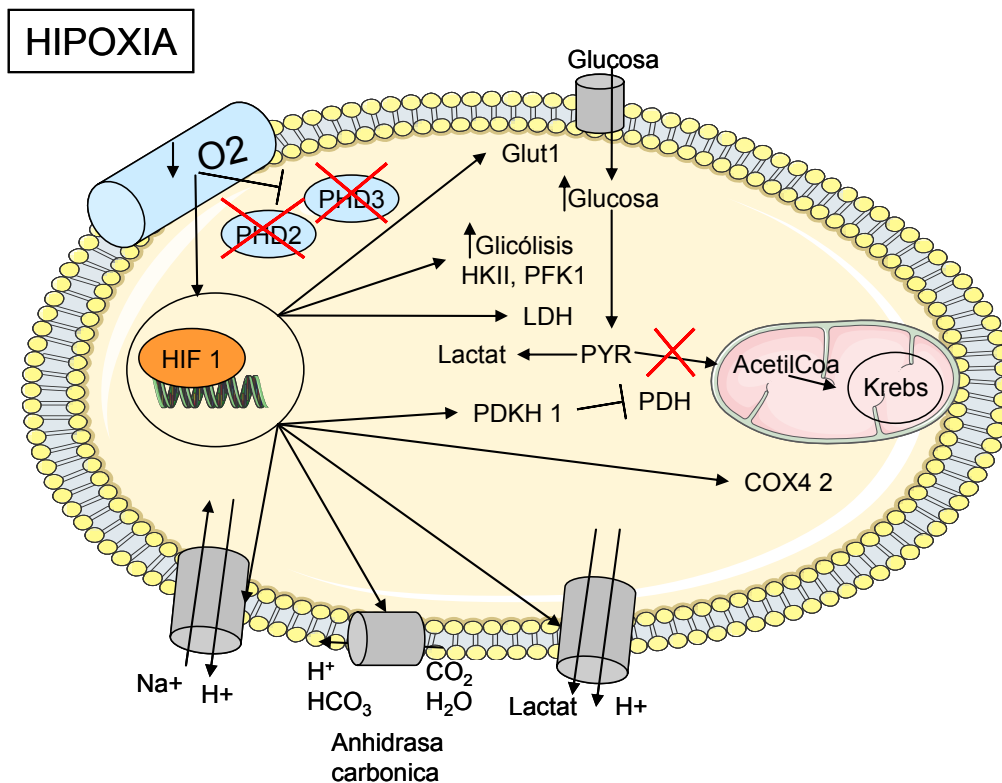


Fig13. Esquema de l'activació de gens mediada per HIF1 per l'adaptació metabòlica a la hipòxia, basat en (Weidemann and Johnson, 2008).

Globalment, HIF potencia la captació de glucosa i el seu metabolisme anaeròbic, augmenta la producció de lactat, disminueix l'activitat mitocondrial i disminueix l'acidificació intracelular.

Durant el desenvolupament fetal és molt important establir un sistema hematopoètic i vascular eficient, i en els dos casos, els gens principals estan regulats per HIF: eritropoietina (EPO) (Semenza, 2003) i Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Simon and Keith, 2008) i angiopoietina 2 (Simon et al., 2008; (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009) HIF 1 α juga un paper important en el desenvolupament: és requerit per la vascularització del embrió i l'angiogenesis (Ryan et al., 1998). VEGF és el factor induït per HIF més conegut (Semenza, 2003). HIF induïx directament VEGF (Forsythe et al., 1996), estabilitza el mRNA (Levy et al., 1998) i n'augmenta l'activitat incrementant el seu receptor (Gerber et al., 1997). La relació entre VEGF i HIF vincula la hipòxia i l'angiogènesi (Shweiki et al., 1992). HIF també és important en el desenvolupament perquè la proliferació cel·lular que es dona en el desenvolupament requereix accés a nutrients i metabolisme adequat, i HIF controla l'entrada de glucosa i el seu metabolisme. Els ratolins homozigots per una deleció en el gen que codifica per a HIF1 α no són viables i moren a la gestació per problemes en vascularització defectuosa, malformacions al cor, i problemes amb el tancament del tub neuronal. (Iyer et al., 1998). La deficiència de ARNT (HIF1beta) també és letal en el desenvolupament.

Les cèl·lules tumorals en a formació del tumor creen una regió interna hipòxica. Aquests tumors hipòxics presenten estabilització de HIF α i es relacionen amb major malignitat, són més resistents a radiació i quimioteràpia. El creixement i la supervivència tumorals depenen del metabolisme de la glucosa i l'angiogènesi, ambdues regulades per HIF. La major expressió de HIF s'associa a un pitjor pronòstic ja que proporciona a un tumor resistència a hipòxia, amb la seva adaptació del metabolisme i a l'acidosis. (Maxwell, 2005).

En moltes cèl·lules tumorals s'ha observat en situacions de normòxia una elevada taxa glicolítica encaminada a la producció de lactat equivalent a la d'adaptació en hipòxia, però en normòxia. És el que es coneix com Efecte Warburg (Warburg, 1956). L'expressió de HIF1 α està incrementada en normòxia, aportant un fenotip glicolític (Bartrons and Caro, 2007; Semenza, 2007; Wallace, 2005; Warburg, 1956). Es relaciona amb progressió del tumor i metastasis. No obstant, la falta d'expressió de HIF1 α en algunes cèl·lules tumorals pot ser deguda a gradient d'oxigen i glucosa present en tumors (Vordermark et al., 2005).

OBJECTIUS

3. OBJECTIUS

OBJECTIU GENERAL:

Esbrinar la influència de la glucosa en la mort cel·lular i en l'adaptació metabòlica en un model d'hipòxia *in vitro* en cèl·lules derivades de neuroblastoma humà.

- 1) Paper de la glucosa en la mort cel·lular induïda per un període d'isquèmia *in vitro*
 - Estudiar si la presència de glucosa durant el període d'hipòxia i en la reoxigenació posterior influencia la mort/supervivència cel·lular.
 - Identificar vies i factors implicats en l'efecte de la glucosa.
 - Avaluar el nivell energètic en la fase d'anòxia i reoxigenació en les diferents condicions experimentals.
 - Valorar si els resultats obtinguts en cèl·lules de neuroblastoma humà són comparables a la resposta dels cultius primaris de neurones de rata.

- 2) Estudiar el paper de la glucosa en la resposta d'adaptació a la hipòxia mediada pel factor induïble per hipòxia 1 α (HIF1 α)
 - Avaluar el paper de la glucosa en l'expressió de HIF1 α .
 - Determinar el funcionament del sistema de degradació de HIF1 α en la reoxigenació en funció de la presència o absència de glucosa.
 - Avaluar la influència de l'estat metabòlic cel·lular en l'expressió de HIF1 α en les diferents condicions experimentals.

MATERIALS I MÈTODES

4. MATERIALS I MÈTODES

4.1. *Cultius cel·lulars*

4.1.1. **Línia cel·lular SH-SY5Y**

La línia cel·lular derivada de neuroblastoma SH-SY5Y va ser proporcionada per la Dra. Coral Sanfeliu procedent de la European Collection of Cell Cultures (ECACC/Sigma).

Emmagatzematge i subcultiu de les cèl·lules

Es mantenen estocs congelats en presència d'un agent crioprotector (DMSO) que protegeix les cèl·lules del dany per cristalls de gel i dels canvis osmòtics per increment de sals al medi extracel·lular. Es descongela un estoc quan es requereix, i es mantenen les cèl·lules en flascó a l'incubador amb un ús màxim de 20 passes per a mantenir les característiques de la línia cel·lular.

Congelar les cèl·lules a partir d'un flascó: netejar amb PBS, tripsinitzar i centrifugar. Resupenem el pelet amb una mescla de 90%FBS, 10% DMSO. Obtenim 6 vials de cèl·lules per a un flascó 150cm, (1:6) 1ml de FBS-DMSO per a cada vial.

Descongelar un estoc: per descartar restes de DMSO, resupenem el 1ml del vial descongelat en 9ml de medi de cultiu, centrifuguem 5 min. a 1.000 rpm i resupenem el pelet en 5mL de medi i ho sembrem en flascó 75cm² perquè comencin millor el creixement.

Subcultivar: Les cèl·lules en ús es mantenen en flascons en medi de creixement en un incubador a 5% CO₂,37°C. Es subcultiva quan la confluència arriba al 80-90%, si cal per sembrar experiment, sinó es fa passi. S'aspira el medi, neteja amb PBS, tripsinitza (tripsina/EDTA 0,25%, 1mM) i centrifuga a 1.000 rpm 5min. i resuspèn pelet amb medi, tot calent (37°C). El format de sembra depèn del tipus d'experiment: generalment 300.000 cèl·lules per a la placa de Petri de 6cm. de diàmetre en 5ml de volum de medi; altres formats com 3.000.000 cèl·lules per a la placa de Petri de 10cm. de diàmetre en 10ml de volum de medi (per estudis de quantificació d'àcids, extraccions mitocondrials), 40.000 cèl·lules en placa de 24 pous en 500µl de medi (estudis assaig luciferasa).

Per a la diferenciació cel·lular en sembrar l'experiment s'afegeix àcid retinoic (RA) de la solució estoc 1X per assolir una concentració final 10µM. Es diferencia

durant 5 dies en presència de RA, amb canvi de medi amb RA als 2-3 dies. Passats els 5 dies es fa l'experiment d'hipòxia.

Medis i reactius:

Medi de creixement

MEM	220ml
Ham's-F12	220ml
FBS	50ml
Penicilina/estreptomicina	5ml (100U/ml/100µg/mL)
NEAA	5ml (100µM)

RA: resuspendre 500mg en DMSO i fer alíquotes 200mM (10X) (-20°C). Per a concentració de treball diluir amb DMSO per assolir 20mM (1X).

4.1.2. línia cel·lular RCC4

La línia cel·lular de carcinoma renal original (RCC4 $_{wt}$) i un clon derivat transfectat establint amb un vector d'expressió per a la proteïna supressora de tumors *Von Hippel Lindau* (VHLp) es van obtenir de la European Collection of Cell Cultures (ECACC/Sigma). La línia RCC4 $_{wt}$ és deficient en l'expressió de VHLp i conté un vector buit pcDNA3 que li confereix resistència a neomicina, mentre en la línia modificada s'ha restablert aquesta deficiència (contenen el mateix vector però en aquest cas codifica per a la proteïna VHLp).

Es creixen en DMEM de baixa concentració de glucosa (5.6mM) complementat amb 10% FBS, 100U/ml penicil·lina, 100µg/ml estreptomicina, 1mM piruvat sòdic i 500 µg/ml G418. Tres dies abans de l'experiment d'anòxia es sembren 10^5 cèl·lules per placa de Petri de 6cm amb volum final de medi de 5ml.

4.1.3. Cultius de neurones

Els cultius primaris de neurones corticals van ser preparats a partir del còrtex frontal/parietal de rates Sprague Dawley (dia de gestació 18) seguint un protocol descrit prèviament (Petegnief et al., 2001). La manipulació dels animals es va dur a terme segons procediments aprovats pel comitè ètic d'experimentació animal de la Universitat de Barcelona.

Les seccions (escorçes) s'inclouen en medi DMEM fred i es netegen les meninges.

Es centrifuga 2 min. a 800rpm

Tractament amb tripsina/EDTA (0.05%/0.53mM) en presència de 200U/ml DNAsa (estoc 15.000U /ml en PBS) i es deixa durant 20 min en agitació per dissociació enzimàtica.

S'atura la tripsinització amb el mateix volum de DMEM:F12 amb FBS 10%. Es centrifuga 5 min. a 800rpm i treure tripsina.

Es resuspen el pelet en medi (1:1 DMEM/F12/glutamax, 10%FBS, 50µg/uL gentamicina (50mg/ml) i 36mM D- Glucosa). A continuació es procedeix a una dissociació mecànica amb pipeta Pasteur (25 vegades aprox.).

Es deixa reposar 5 min. a t.a. per decantar els *debris* més grans no dissociats. S'agafa el sobrenedant que conté les neurones dissociades i es centrifuga 5 min. a 800rpm.

Es resuspen el pelet en medi i es contenen les cèl·lules per sembrar. La suspensió cel·lular es sembla en plaques Falcon de 24 pous prèviament tractada amb polilisina (25µg/ml) a una densitat $0.5 \cdot 10^6$ cèl·lules/mL.

Les cèl·lules es mantenen en cultius fins a 14 dies a 37°C en una atmòsfera de 5% CO₂ 95% aire. El medi de cultiu es canvia els dies 7 i 10 *DIV* (*Days In Vitro*).

S'afegeix 6µM d'arabinosid de citosina (ARA-C, Sigma) el dia DIV4 i 3µM el dia 7 i 10 DIV per evitar la proliferació d'altres tipus cel·lulars no neuronals i disminuir la proporció de sèrum.

Estoc *poly-L-lisine*: 0.5mg/ml en aigua. Preparar alíquotes de 5ml i congelar. Abans d'usar diluir 1:1000 en aigua i autoclavar.

4.2. Isquèmia in vitro : Privació d'Oxigen i Glucosa (OGD)

4.2.1. OGD en caixa hermètica i flux de gasos

- OGD en SH-SY5Y

Aquest és el model d'anòxia usat en els treballs exceptuant només l'estudi en neurones i estudis en SH-SY5Y per a concentracions d'hipòxia més elevades (0.6-1%O₂), casos en què s'ha usat l'incubador d'hipòxia. El model que s'ha establert per a les cèl·lules SH-SY5Y diferenciades és per anòxies de 15h. i posterior reoxigenació.

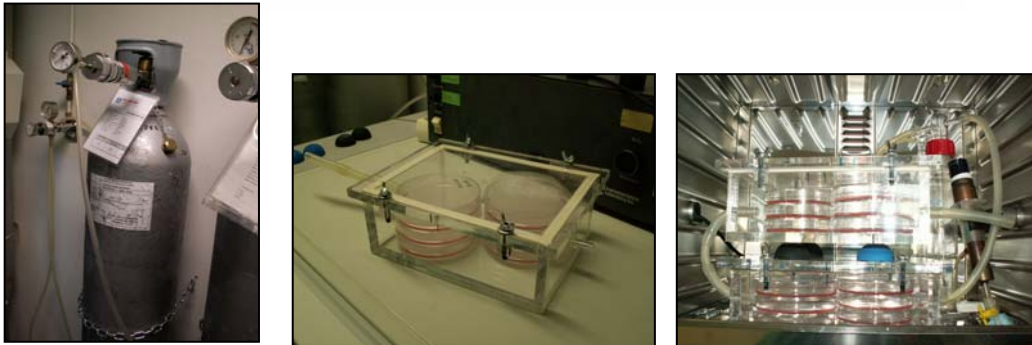
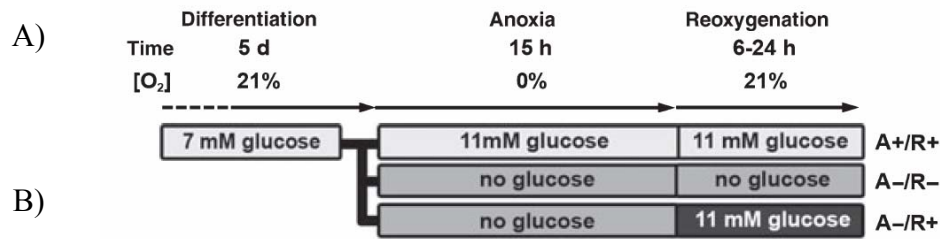


Fig2. A) Esquema del model d'isquèmia in vitro en SH-SY5Y: diferenciació amb RA, anòxia 15h i reoxigenació.

B) Imatges del sistema d'anòxia basat en una o dues caixes hermètiques cedides per la Dra. Gina Hotter i Dra. Anna Sola (IIBB-CSIC) on incubar les cèl·lules i un circuit per al pas de gas humidificat que no conté oxigen.

Passats 5 dies de diferenciació (RA) es sotmet les cèl·lules SH-SY5Y a anòxia. Es priva d'oxigen i glucosa (**OGD Oxygen Glucose Deprivation**) o exclusivament d'oxigen (**OD Oxygen Deprivation**) generalment durant 15h a menys que s'indiqui el contrari. Posteriorment es permet la reoxigenació i s'afegeix un volum de medi nou amb o sense glucosa. S'agrupa les cèl·lules en tres grups depenent de la presència o absència de glucosa (G) en l'anòxia (A) i en la reoxigenació (R) (veure esquema Fig2)

- **A+/R+**: OD + R amb G Medi amb 11mM glucosa en l'anòxia (medi OD) i amb 11mM glucosa en la reoxigenació (medi OD).
- **A-/R-**: OGD + R sense G Medi sense glucosa en l'anòxia (medi OGD), sense glucosa en la reoxigenació (medi OGD).
- **A-/R+**: OGD + R amb G Medi sense glucosa en l'anòxia (medi OGD) amb 11mM glucosa en la reoxigenació (s'afegeix medi 44mM Glucosa).
- **Control normòxia** 11mM glucosa (medi OD)

Experiment d'anòxia

Els volums de medi a afegir depenen del sistema de sembrat de les cèl·lules (veure taula).

S'aspira el medi de creixement i es fa un rentat previ amb el medi d'anòxia corresponent a cada grup.

S'afegeix un volum mínim del medi d'anòxia corresponent i es posa les plaques dins una caixa tancada hermèticament i s'hi aporta un flux continu de gasos humidificat (80% humitat) mescla 95% N₂ 5% CO₂ a 37°C.

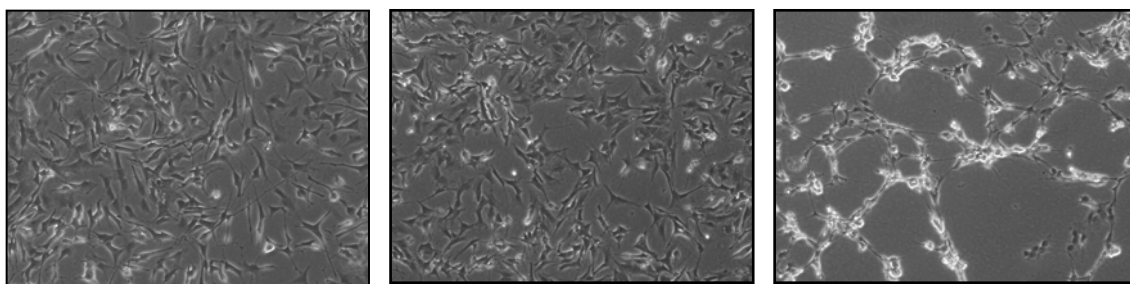


Fig3. Cèl·lules SH diferenciades sotmeses a 15h de normòxia, OD i OGD respectivament.

En acabar el període d'anòxia (15h) es reoxigenen les cèl·lules. S'afegeix un volum de medi nou equivalent a 1/3 del volum en l'anòxia corresponent en cada cas i es mantenen a l'incubador a 37°C 5% CO₂ durant el temps de reoxigenació indicat.

El control de normòxia amb el mateix medi d'OD, se li apliquen els mateixos rentats i el mateix temps en paral·lel.

	Medi creix	medi A	medi afegit en R
A+/R+	medi RA	medi OD	medi OD
A-/R+	medi RA	medi OGD	medi 44mM Glucosa
A-/R-	medi RA	medi OGD	medi OGD

Sistema	Volum de medi en creixement	Volum en A	Volum afegit en R	VF en R
Placa Petri 10cm diámetro	10ml	6ml	2ml	8ml
Placa Petri 6cm diámetro	5ml	3ml	1ml	4ml
Placa 24 pous	500µl	500µl		

Taula 1. Taula de volums de medi emprats dependent del sistema de sembra en SH.

Reactius

Medis anòxia i reoxigenació

Medi OD VF 500mL: RPMI 500mL

5mL HS

5ml Penicil·lina/estreptomicina

Medi OGD VF 500mL: RPMI sense Glucosa

5mL HS

5ml Penicil·lina/estreptomicina

Medi 44mM Glucosa per reoxigenació (A-/R+) :VF 50mL

49 ml Medi OGD complet

1.1ml D-Glucosa 2M

- OGD en RCC4

Tant l'anòxia com la reoxigenació es duen a terme com en la línia SH-SY5Y, amb medis de cultiu diferents.

Abans dels experiments d'OGD en RCC4, es fa un rentat amb el medi de creixement DMEM amb glucosa complet (OD) o el medi DMEM sense glucosa complet (OGD) (veure primer apartat) corresponent al tractament, tal com en el cas de SH-SY5Y. S'afegeix el volum final de 3ml per placa de Petri de 6cm, segons el tractament.

Tal com es detectava per a les SH-SY5Y, en el cas de la línia modificada (RCC4-pVHL) manté la morfologia després de 15h d'OD, però després de 15h. d'OGD es detecta un canvi, les cèl·lules perden característiques fusiformes i s'adhereixen pitjor al substrat. A partir d'unes hores de reoxigenació semblen recuperar la morfologia.

La línia RCC4 wt no demostrava canvis morfològics tant clars ni pèrdua de l'adherència al substrat.

4.2.2. OGD en incubador d'hipòxia

- Cultius primaris de neurones

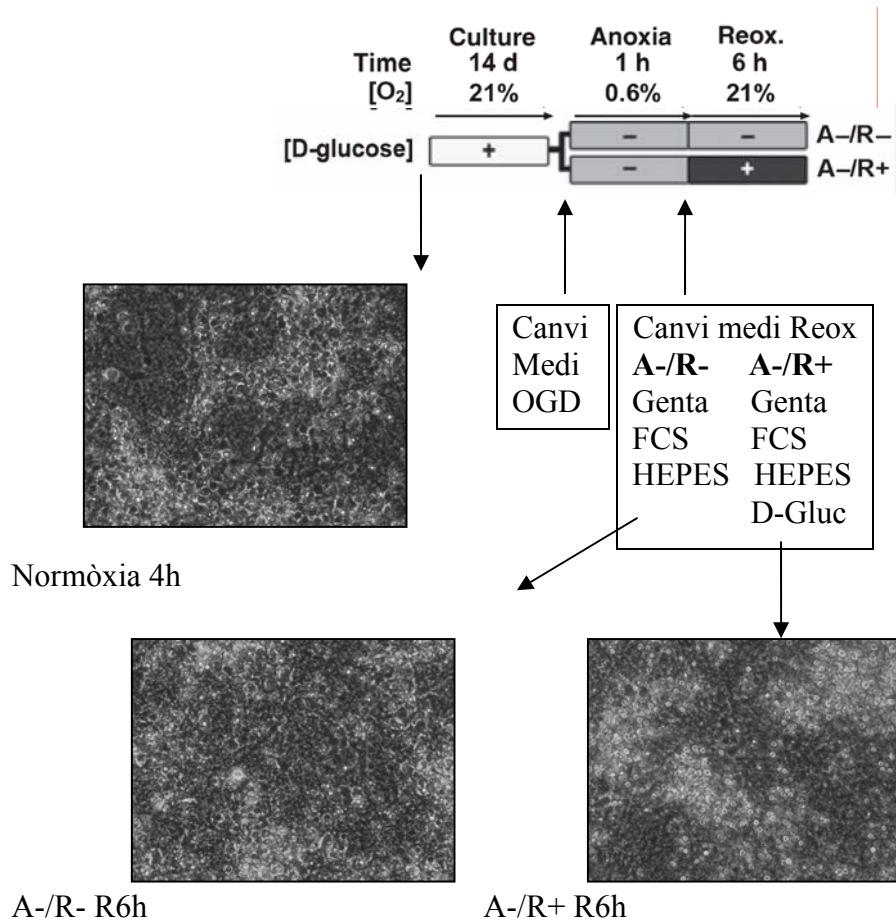


Fig4. Esquema de la hipòxia i reoxigenació en cultius neuronals i imatges en acabar la reoxigenació.

Experiment d'anòxia

Es sotmet cultius neuronals en plaques *multiwell* de 6 pous de 14 DIV a OGD de 1h dins l'incubador d'hipòxia GalaxyR (RSBiotek Cultek, Madrid) al 0.6% d'oxigen a 37°C i a posterior reoxigenació de 6h. afegint D-Glucosa (A-/R+) o L-Glucosa, que no és metabolitzable i per tant equival a l'absència de glucosa en el cultiu (A-/R-). Tenim una placa control que mantenim sempre en normòxia i realitzem els mateixos rentats de medi.

Prèviament a la hipòxia es substitueix el medi de cultiu pel medi d'anòxia, amb un rentat previ (DMEM suplementat amb 25mM L-glucosa, 15mM HEPES pH7.4 i B27 (1:50, invitrogen)).

Es sotmeten les cèl·lules a una hora d'hipòxia.

Després es reoxigenen: es canvia el medi per DMEM amb 50µg/mL gentamicina, 10% FBS, 15mM HEPES pH 7.4 i B27 (1:50) complementat amb 25mM de L-glucosa (A-

/R-) ó 25mM de D-glucosa(A-/R+). S'incuba les cèl·lules en condicions atmosfèriques a 37°C durant 6 hores.

En acabar la hipòxia i la reoxigenació es fan extraccions per a assaig caspasa tal com s'indica a l'apartat corresponent.

Reactius:

Medi OGD 10ml	Medi normòxia 10ml	R OGD 20ml A-/R-	R OD 20ml A-/R+
250 µl 1M L-Gluc	125 µl 2M D-Gluc	500 µl 1M L-gluc	250 µl 2M D-Gluc
150µl HEPES	150µl HEPES	300 µl HEPES	300 µl HEPES
10ml DMEM	10ml DMEM	20ml DMEM	20ml DMEM
200 µl B27	200 µl B27	400µl B27	400µl B27
		40µl gentamicina	40µl gentamicina
		200µl FCS	200µl FCS

- OGD de percentatge d'oxigen més elevat en la línia cel·lular SH-SY5Y

Per experiments complementaris que requereixen concentracions majors d'oxigen (0.6-1%) s'usa l'estació de treball d'hipòxia (Invivo 400 Ruskinn/Cultek) fixant les concentracions d'oxigen requerides. S'usa tal com descrit previament (Ginouves et al., 2008).

El protocol per als experiments és el mateix que per a la hipòxia amb flux de mescla de gasos: les cèl·lules SH-SY5Y es diferencien amb RA segons el protocol descrit, els medis d'anòxia i reoxigenació són els mateixos i es fan rentats previs a l'anòxia.

- **Annex: Productes utilitzats en cultius:**

Reactiu	Abreviatura	Referència	Casa comercial
MEM+Glutamine	MEM	31095-029	Invitrogen GIBCO
Ham's F12	F12	21765-029	Invitrogen GIBCO
Foetal Bovine Serum	FBS	10500-064	Invitrogen GIBCO
Penicillin-Streptomycin	PS	15140-122	Invitrogen GIBCO
NEAA	MEM non-essential a.a.	11140-035	Invitrogen GIBCO
All-trans-Retinoic Acid	RA	554720	Calciochem
RPMI +	RPMI	21875-034	Invitrogen GIBCO
RPMI – Glucose free	RPMI G-	11879-020	Invitrogen GIBCO
Horse serum	HS	16050-122	Invitrogen GIBCO
Trypsin-EDTA (0,25%, 1mM)	Tripsina/EDTA	25200-056	Invitrogen GIBCO
Tripsina/EDTA (0.05%/0.53mM)		25300-054	Invitrogen GIBCO
D-Glucosa		G7021-100G	SIGMA
L-Glucosa		G5500-5G	SIGMA
Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose (5.6mM)	DMEM	31885-023	Invitrogen GIBCO
DMEM NO Glucose (5.6mM)	DMEM NO G	11966-025	Invitrogen GIBCO
piruvat sódic		11360	Invitrogen GIBCO
G418 geneticina		10131-027	Invitrogen GIBCO
polilisina		P-1524	SIGMA
DMEM glutaMAX		21885-025	Invitrogen GIBCO
gentamicina	Genta	15750-045	Invitrogen GIBCO
arabinosid de citosina	ARA-C	C-1768	SIGMA
dimetilsulfòxid	DMSO	D2650	SIGMA
	B27	17504-044	Invitrogen GIBCO
Fetal calf serum	FCS	16000-044	Invitrogen GIBCO
Desoxiribonucleasa	DNAsa	D-0525	SIGMA
HEPES		15630056	Invitrogen GIBCO

- ZVAD (Z-Val-Ala-DL-Asp-(OMe)-fluoromethylketone, N-1560 Bachem) 1mg: resuspendre en DMSO per obtenir 50mM i al·licuar. A l'inici de la reoxigenació s'afegeix a les plaques fent una dilució 1/1.000 per tenir concentració final 50µM).

- Calpeptina (03-34-0051 Calbiochem) s'afegeix calpeptina (estoc 20mM en DMSO) a una concentració final de 30µM a l'inici de la reoxigenació, i a les plaques control hi afegim el mateix volum de DMSO (vehicle) en paral·lel.
- MG132: (474760, Calbiochem/Bionova) resuspendre 5mg en etanol per a tenir solució 10mM i aliquotar.
- DMOG (Dimethylolalylglicina, 71210, Cayman) fer solució estoc en DMSO per obtenir 1M.
- Fumarat magnesium salt (43,366-8, SIGMA). S'afegeix al medi a una concentració final de 20mM durant 6h. a cèl·lules SH-SY5Y.

4.3. Extracció de proteïnes

4.3.1. Fraccionament subcel·lular:

Les fraccions citoplàsmica i mitocondrial de SHSY5Y es van obtenir amb variacions sobre protocols existents (Ferrer et al., 2003; Liang et al., 2003) a partir de plaques de 10 cm (3 milions de cèl·lules per placa). Per obtenir una mostra de fracció mitocondrial s'ajuntaven tres plaques.

Tampó de lisis: 20mM HEPES pH7.5, 250mM sacarosa, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM ditiotretol (DTT), 0.1mM fenilmetilsulfonil florur (PMSF), 2µg/mL aprotinina, 10µg/mL leupeptina, 5µg/mL pepstatina).

Extracció

Extracció en gel en tot moment. En el tractament de normòxia i OD s'aspira el medi directament de la placa i es renta amb 3ml PBS fred. Les cèl·lules es desenganxen amb *scraper* i 500µl de PBS (phosphate-buffered saline) i cada tres plaques es recol·lecten en un únic tub. Per centrifugació breu i ràpida s'obté el pelet cel·lular, que es resuspen amb 300µl de tampó i s'homogenitza mecànicament amb l'èmbol (*20strokes*). En cas del tractament d'OGD les cèl·lules perden molta adherència a la placa i es desenganxen fàcilment, així que no s'aspira el medi directament de la placa per evitar perdre mostra sinó que es recol·lecta i centrifuga per precipitar les cèl·lules. Es neteja el pelet amb PBS i es resuspen amb el tampó de lisis, seguint el procediment descrit.

Mitjançant posteriors centrifugacions a 4°C s'obtenen les diferents fraccions (veure figura). Primera centrifugació 10 min 800g, s'obté una fracció enriquida en nuclis (pelet), i posteriorment (15 min 10.000g) una fracció mitocondrial (pelet) i citoplàsmica (molt diluïda). Els dos pelets es resuspenen amb tampó de lisis. En el cas de l'estudi de

la proteïna *Apoptosis Inducible Factor* (AIF) (primer treball presentat) es pren aquest primer pelet resuspès com a fracció enriquida amb nuclis.

La puresa dels extractes és avaluada per WB amb els marcadors coneguts. La concentració de proteïna dels extractes es determina pel mètode Bradford. (Bio-Rad).

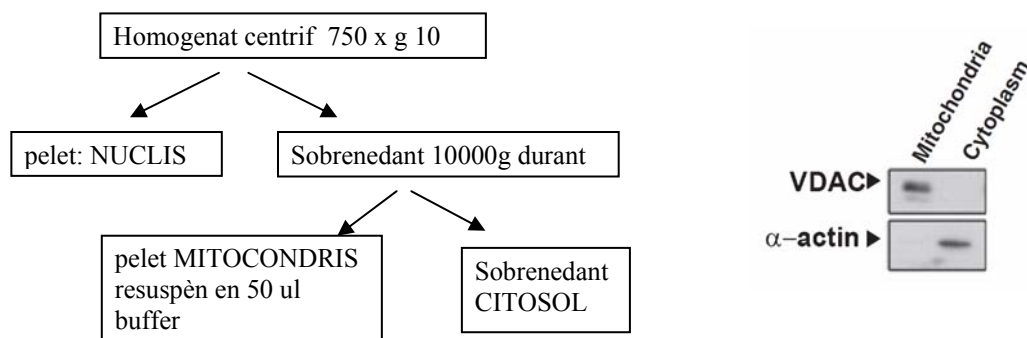


Fig5. Esquema de les centrifugacions consecutives per l'extracció fraccionada. Control de puresa de les fraccions mitocondrial i citoplasmàtica per detecció de proteïnes específiques per cada compartiment, VDAC, voltage dependent anion channel (proteïna de la membrana mitocondrial externa) i actina respectivament.

Extracció: protocol detallat

Abans de treure les plaques de la OGD es prepara el tampó d'extracció (afegir PMSF just al moment).

Es treuen les plaques de l'anòxia i es mantenen sempre en gel

En la OD i normòxia s'aspira el medi, es fa un rentat amb 3 ml de PBS fred per placa i s'aspira.

S'ordeneen les plaques: cada tres plaques formen un tractament i se n'obindrà una fracció mitocondrial.

S'afegeix 500µl de PBS en la primera de les 3 plaques, es rasca amb cura de no perdre mostra i es passa aquest volum a la segona, es rasca i es passa a la tercera.

Es guarda el volum final de les tres plaques en un tub eppendorf també en gel rotulat "nuclis".

Es torna a repetir el "rascat" amb 500µl més de PBS.

Es fa un pols de centrifuga a màxima velocitat i es treu el sobrenedant.

Extracció tractament de OGD

En molts casos aquest tractament fa que les cèl·lules quedin surant a la placa, tot i que no totes mortes. Per evitar perdre mostra quan s'aspira el medi en l'extracció de mitocondris, en aquests casos es farà:

Es recull en un tub eppendorf part del medi de les plaques, deixant-ne una part a la placa per poder rascar les cèl·lules.

Es recullen les cèl·lules al mateix tub i es centrifuguen a 10000rpm durant 5 min

S'aspira el sobrenedant i s'afegeix 1ml de PBS per rentar seguit d'un pols de centrifuga.

S'aspira el sobrenedant.

A partir d'aquí convergeixen els dos protocols. S'afegeix PMSF al tampó d'extracció i es resuspenen els pelets en 300µl del Buffer.

S'homogenitza amb èmbol dins el mateix epi fent 20 *strokes* (pujar i baixar per canviar la fracció de líquid que estàs processant)

S'inicien centrifugacions a 4°C segons esquema anterior i es congelen els productes.

4.3.2. Extractes cel·lulars totals

Els extractes cel·lulars de SHSY5Y es van preparar a partir de plaques de Petri de 6cm (300.000 cèl·lules /placa). Les cèl·lules es recol·lecten rasant i es centrifuguen 5min. a 1.000 rpm. Es fa una neteja amb PBS fred i el pelet cel·lular es resuspèn i lisa amb 100µL de tampó de càrrega per a western blot 1X Laemmli Sample Buffer (LSB) (10mM tampó fosfat pH7, 10% glicerol, 2.5% SDS, 0.5mg/mL DTT, 0.16 mg/mL blau de bromofenol) i es filtra per centrifugació (Filtres Nucleospin, Macherey-Nagel) per trencar la cromatina desnaturalitzada. El percentatge del volum es carrega per l'anàlisi en western blot.

En el cas dels extractes cel·lulars totals per a l'estudi de HIF1α (segon treball) els extractes totals es resuspenen en tampó Laemmli 1.5X (150mM Tris-HCl pH 6.8, 1.5% SDS, 15% glicerol) sense Blau de Bromofenol. Això permet determinar la concentració proteica en aquests extractes donat que blau de bromofenol interfereix. La dilució és major que 1X perquè contempla que pugui quedar un volum mínim de PBS en el rentat.

Les cèl·lules sotmeses a OGD es recol·lecten amb "rasqueta" perquè s'adhereixen pitjor. Es centrifuguen (pols) a 4°C es fa un rentat amb 1ml PBS i es centrifuga un altre cop i es resuspen el pelet en 100 µl de Laemli 1.5X. En el cas de normòxia i OD les cèl·lules s'adhereixen millor a la placa i deguda la rapidesa de degradació de HIF1alfa amb oxigen, ràpidament i en fred s'aspira el medi directament de la placa i es fa un rentat amb PBS fred. S'afegeixen 100 µl de Laemli 1.5X directament a la placa i assegurant que s'hagin lisat totes les cèl·lules, es recol·lecta el lisat.

En ambdós casos es congelen els extractes. En descongelar es soniquen i es quantifica la proteïna usant l'assaig de BCA (Thermo Scientific Cultek).

4.4. Western Blot

4.4.1. Quantificació de proteïna:

- Bradford (Bio-Rad)

La determinació de la concentració de proteïnes es determina en els casos indicats (extractes fraccionats, kits d'ELISAs) usant el kit Bio-Rad Protein Assay basat en el mètode de Bradford. L'absorbància màxima per la solució de Coomassie Brilliant Blue G-250 canvia de 465nm a 595nm quan interacciona amb proteïnes.

Solucions

Bio_RAD Protein Assay (Bio Rad)

Solució BSA: Albúmina de sèrum boví a 0.2mg/mL

Assaig

Es descongelen les mostres i es mantenen en gel. S'utilitzarà una placa de 96 pous per llegir la luminiscència.

Es prepara una dilució de Bradford en aigua (1:5). Es prepara directament a la placa una recta patró amb concentracions conegudes de proteïna a partir de la concentració stock de BSA (no s'afegeix aigua per compensar el volum perquè es va observar que no provoca diferències en la lectura). S'afegeix el volum d'aigua primer a cada pou i després el volum de BSA corresponent. Als pous corresponents a les mostres s'afegeix 1-2 µl de mostra depenent del tipus d'extracció. Es fan duplicats tant per la recta patró com les mostres. Després s'afegeixen 200µl de reactiu Bradford 1:5 i s'incuben 15min. a t.a. Es mesura l'absorbància a 595nm. La concentració de proteïnes de cada mostra es calcula interpolant el valor d'absorbància de la mostra en la recta patró de BSA que es prepara a cada assaig.

Std: µg de proteïna	0	0	0.2	0.4	0.8	1.6	2.4	3.2	4
µL(BSA 0,2mg/mL)	0	0	1	2	4	8	12	16	20

Taula 2. recta patró per a la quantificació de proteïna

- Assaig àcid Bibinboninic BCA (Thermo Scientific Cultek).

Funcionament equivalent al protocol anterior. S'afegeixen els volums corresponents d'aigua i BSA (1mg/ml) per a fer la recta patró. Es carreguen 3µl de

mostra i 7µl d'aigua en els pous corresponents. S'afegeixen 200ul d'una mescla 1/50 de solucions A/S. S'incuben 30min a 37°C i es fa la lectura.

Solució BSA: Albúmina de sèrum boví a 1mg/mL

Std: µg de proteïna	0	0.5	1	2.5	5	7.5	10
µl de BSA 1µg/µl	0	0.5	1	2.5	5	7.5	10
µl aigua	10	9.5	9	7.5	5	2.5	0

Taula 3. recta patró per a la quantificació de proteïna

4.4.2. Western blot

La tècnica de western blot és un mètode per detectar l'expressió o modificacions de proteïnes específiques a partir d'un extracte proteic. La tècnica de western blot es realitza com descrit prèviament (Gorina et al., 2005). Es fa córrer la mostra en un gel d'electroforesis que separa les proteïnes de l'extracte segons el seu pes molecular. Les proteïnes es transfereixen a una membrana i aquesta s'incuba amb un anticòs específic per la proteïna a detectar (anticòs primari). Posteriorment la membrana es renta per eliminar l'excés d'anticòs i s'incuba amb un altre anticòs que reconeix l'anticòs primari degut a l'espècie d'origen. Quan la reacció es fa per quimioluminiscència l'anticòs secundari incorpora un enzim peroxidasa que en afegir un agent luminiscent produeix luminiscència proporcionalment a la quantitat de proteïna. S'incuba un minut la membrana amb l'agent luminiscent i s'exposa a un film fotogràfic amb la membrana creant una senyal, la intensitat es calcula per densitometria.

Solucions:

Solució 1	0,75M Tris base (MW= 121,14), pH 8.8 amb HCl 0,2% Dodecil sulfat de sodi (SDS) en aigua Milli-Q
Solució 2	30% Acrilamida / Bis Solution, 37,5:1 (Bio-Rad)
Solució 3	0,25M Tris base (MW= 121,14), ajustar a pH 6.8 0,2% Dodecil sulfat de sodi (SDS) en aigua Milli-Q
Persulfat amònic	13% Persulfat amònic
TEMED	TEMED (Sigma)
Tampó electròlit	25mM tris-base (MW = 121,14), no s'ajusta el pH

	192mM glicina (MW = 75,07) en aigua destil·lada
Tampó Transferència	25mM Tris-base, no s'ajusta el pH 192mM glicina (MW = 75,07) 20% v/v Metanol
Tampó de càrrega	0,5M NaPi (pH7)=0.5M Na ₂ HPO ₄ +0.5M NaH ₂ PO ₄ 20% glicerol 4% SDS 10% DTT (2, 4-ditiotreitol) 0.05% de Blau de Bromofenol en aigua destil·lada
Tampó T-TBS	0.02M Tris HCl, ajustar al pH a 7.5 0.150M NaCl 0.05% Tween 20 en aigua destil·lada
Solució Luminol	1.25mM Luminol Na 0.03% H ₂ O ₂ 0.1M Tris HCl, ajustem a pH = 8.6 / 8.7
Solució Enhancer	11mg Àcid P-OH-cumàric en 10 mL DMSO

Protocol

- **Preparació de les mostres:**

Per l'anàlisi de l'expressió proteica en mostres d'extracte total amb blau de bromofenol es carrega un 10% del volum de la mostra en gels SDS-PAGE.

Per a mostres d'extracte total sense blau de bromofenol (segon estudi) es carrega el volum corresponent a 20µg de proteïna.

Per extractes fraccionats de la mateixa mostra (citoplàsmics, mitocondrials i nuclears) es carrega el volum corresponent a 10µg de proteïna quantificats per Bradford. El volum s'ajusta a totes les mostres per igual amb aigua. El tampó de càrrega està concentrat 3X, es porta a 1X amb el volum de la mostra.

En tots els casos s'incuben les mostres a 95°C durant 5 min. per desnaturalitzar totalment les proteïnes.

- **SDS-PAGE (*SDS PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*)**

Els gels d'acrilamida amb SDS mantenen les proteïnes desnaturalitzades. L'SDS s'uneix a les proteïnes, les desplega i els hi aporta càrrega negativa. Durant l'electroforesis, les proteïnes migraran cap a l'elèctrode positiu. Les proteïnes més petites avançaran més ràpidament a través de la malla d'acrilamida de manera que les proteïnes quedaran separades segons el seu pes molecular. El percentatge d'acrilamida determina la resolució del gel, a major concentració millor separació de les proteïnes de baix pes molecular.

Per fer l'electroforesis s'utilitza el kit Mini-Protean (Bio-rad). Es preparen dos gels, un gel separador i, per sobre, un gel apilador amb gran porus de poliacrilamida (4%). El gel apilador es prepara a pH 6,8, dues unitats de pH per sota del pH del tampó d'electroforesis. Aquestes condicions permeten que les proteïnes s'agrupin i entrin al gel separador alhora. La taula mostra els reactius per preparar els gels.

	6%	8%	10%	12%	15%	APILADOR
Solució 1	4mL 6mL	4mL 6mL	4mL 6mL	4mL 6mL	4mL 6mL	-
Acrilamida	1.6mL 2.4mL	2.16mL 3.24mL	2.68mL 4.02mL	3.2mL 4.8mL	4mL 6mL	0.225mL 0.45mL
Solució 3	- -	- -	- -	- -	- -	0.975mL 1.95mL
H₂O	2.4mL 3.6mL	1.84mL 2.76mL	1.32mL 1.98mL	0.8mL 1.2mL	-	0.775mL 1.55mL
PSA 13%	40µL 60µL	40µL 60µL	40µL 60µL	40µL 60µL	40µL 60µL	20µL 40µL
TEMED	10µL 15µL	10µL 15µL	10µL 15µL	10µL 15µL	10µL 15µL	5µL 10µL

Taula 4. Reactius per a la preparació dels gels

Un cop els gels han polimeritzat es col·loquen en la cubeta d'electroforesis que s'omple amb el tampó d'electroforesis 1x. Les mostres es carreguen als pous amb puntes primes. Reservem un carril per carregar 6µl del marcador de pes molecular (*Precision Plus Protein Standards*, Bio-Rad). Es connecta la cubeta a la font i les proteïnes es fan córrer a 100V fins que s'observa que el front arriba al final del gel. El tampó de càrrega porta un colorant (Blau de Bromofenol) per poder observar com avança el front.

- **TRANSFERÈNCIA PER *ELECTROBLOTTING***

Per tal que les proteïnes siguin accessibles a la detecció amb l'anticòs, es transfereixen a una membrana de *Polyvinylidene fluoride* (PVDF) (Immobilon, Millipore). El gel d'acrilamida es posa en contacte amb la membrana i mitjançant el pas de corrent elèctric les proteïnes migren cap a la membrana mantenint la seva organització en el gel (transferència). Perquè les proteïnes quedin unides a la membrana és necessari activar-la posant-la 2 minuts en metanol i un minut en tampó de transferència. Muntem la transferència posant les esponges, el paper Whatman (prèviament molls amb tampó de transferència) el gel i la membrana activada en contacte: col·loquem primer esponja, a sobre 2 papers Whatman per protegir el gel, el gel, la membrana 2 papers més i l'altra esponja. Les proteïnes transfereixen del pol negatiu al positiu. La transferència es realitza a 100v durant 90minuts. El temps de transferència també es pot ajustar al tamany de la proteïna que volem detectar, doncs, proteïnes petites transferiran més ràpidament cap a la membrana.

- **BLOQUEIG, TINCIÓ i IMMUNOBLOT**

Solució blau de Coomassie per tenyir membranes PVDF

Disoldre 2.5g Coomassie blau brillant en 1 litre de metanol.

En aquest ordre afegim: 250mL de metanol ,750mL aigua,500mL d'àcid acètic i es filtra la solució i es mescla.

Després de la transferència es tenyeix la membrana per determinar que la transferència ha anat correctament. Es col·loca la membrana en solució blau de Coomassie 5 minuts, destenyim amb 70%metanol fins que es vegin bé només les bandes de les proteïnes. Per destenyir, es manté la membrana en metanol 100% durant 5 min.

No caldria bloquejar la membrana de PVDF, però es fa per si l'anticòs no és molt sensible i l'especificitat és baixa. Es manté bé la membrana en T-TBS fins a mullar-la completament. S'incuba 1h en moviment amb solució de bloqueig amb 5% llet (2.5 g. de llet en 50 ml T-TBS). S'incuba la membrana tota la nit en agitació a 4°C amb l'anticòs primari diluït en tampó T-TBS , 1% llet. S'hi afegeix acida sódica 0.02% (dilució 1/1.000 de l'estock) per poder-lo conservar unes setmanes a 4°C (Veure taula anticossos i dilucions). L'endemà es fan 3 rentats de 10 min. en agitació amb T-TBS, i s'incuba 1h. a temperatura ambient amb anticòs secundari corresponent depenent de l'espècie on s'ha generat el primari. Es fan 3 rentats més amb T-TBS.

En el cas d'anticossos de baixa sensibilitat com Pro-564-HIF la membrana es bloqueja durant la nit i s'incuba amb l'anticòs primari 2.5h a t.a. per incrementar la unió específica. La detecció del senyal es fa amb un sistema d'imatge Versadoc (BioRad) i amb un substrat per la reacció quimioluminiscent d'elevada sensibilitat (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific)).

Primaris	Dilució 1ari	casa comercial	CODI	Dilució 2ari	2ari
citocromC	1:1.000	BD Biosciences, Pharmingen Madrid	clon 7H8.2C12	1:2.000	R
AIF	1:2.000	Serotec/Bionova, Madrid		1:2.000	R
Heat shock protein 70	1:2.000	Millipore MADrid	(hsp70, clone W27)	1:2.000	M
VDAC	1:1.000	Abcam, Cambridge, UK	(ab15895)	1:10.000	R
α actina	1:5.000	Sigma/ Assay Designs Ann Arbor CSA-400		1:10.000	R
TATA binding protein (TBP)	1:2.000	Abcam, Cambridge, UK	(ab818)	1:2.000	M
Lamina A/C	1:200	Millipore MADrid	(clon JOL2)	1:1.000	M
α II-espectrina	1:1.000	Millipore MADrid	(Ct: MAB1622)	1:2.000	M
HIF1 α	1:2000	Novus Biologicals	NB100-449	1:2.000	R
HIF1 β	1:1000	Abcam	Ab2771	1:2.000	M
Glut 1	1:1000	Abcam	Ab652	1:2.000	R
HKII	1: 1.000	Sta Cruz	Sc-6521	1:2.000	G
ATP sintasa β	1: 1.000	BD Biosciences	#612518	1:2.000	M
Pro 564-HIF	1:1.000	Cell Signalling	#3434	1:2.000	R
PHD2	1:1.000	Novus Biologicals	NB100-138	1:2.000	R
β tubulina	1:50.000	Sigma	T-4026	1:10.000	M
GFP	1:5.000	Abcam	ab290	1:2.000	R

A n t i c o s s o s s e c u n d a r i s	D i l u c i ó	C a s a c o m e r c i a l
Anti-mouse Ig peroxidase linked antibody (M)	1:4000	Bio-Rad
Anti-rabbit Ig peroxidase linked antibody (R)	1:2000	Amersham
Anti-goat Ig peroxidase linked antibody (G)	1:2000	Amercham

- **DETECCIÓ PER QUIMIOLUMINISCÈNCIA**

La membrana s'incuba amb una solució de luminol i enhancer durant 1 minut. La detecció de la llum produïda per la reacció de la peroxidasa es fa posant en contacte la membrana amb una pel·lícula fotogràfica dins d'un cassette.

- **ANÀLISI PER DENSITOMETRIA**

La intensitat de banda es quantifica amb el programa informàtic Quantity One (BioRad, Barcelona). Els resultats es calculen com a ratio entre la intensitat de banda de la proteïna en estudi i la intensitat de banda de una proteïna control de càrrega. Per al control de càrrega es re-incuben les membranes amb els corresponents controls de càrrega, com actina, ATP i sintasa, TBP. En cas de necessitar-ho, es fa un "stripping" amb la solució Re-Blot western blot recycling kit (2060 Chemicon international): assecant la membrana, activant amb metanol 1 minut, neteja amb T-TBS 5 min i amb solució de re-blot 1X 10 min en agitació suau. Després 2 rentats amb T-TBS, bloqueig amb 5% llet i es segueix el protocol d'immunodetecció tal com s'ha descrit anteriorment.

4.5. Estudi de la mort cel·lular

4.5.1. Contatge cel·lular de la tinció amb Iodur de Propidi (IP):

La mort cel·lular induïda per l'anòxia i la reoxigenació es determina per tinció dels nuclis amb Iodur de propidi (IP) en les cèl·lules sense fixar. IP (Sigma, Fluka) només s'internalitza en cèl·lules amb la membrana danyada, s'uneix als àcids nucleics i per tant es considera que les cèl·lules fluorescents són cèl·lules mortes. La tinció de tots els nuclis amb Hoechst33342 (Invitrogen) permeable a totes les cèl·lules permet fer una ratio entre nombre de cèl·lules IP positives (mortes) vs. nombre de cèl·lules total.

IP i Hoechst s'afegeixen al medi a la concentració final de 250ng/mL i 2.5µg/ml respectivament, s'espera 5 min. i s'observa al microscopi. Per a cada placa es realitzen entre 3 i 6 fotos de camps aleatoris en un microscopi invertit de fluorescència Olympus 1X70 amb els filtres adequats per a fluorescència de Hoechst i IP. Els nuclis tenyits són comptats amb el software AnalySIS (Olympus) i el percentatge de mort és calculat dividint el nombre de nuclis IP positius / nombre Hoechst positius per cada foto.

4.5.2. Anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux.

L'apoptosi es pot determinar estudiant el cicle cel·lular per citometria de flux. La permeabilització de les cèl·lules, i la tinció amb IP permeten obtenir una distribució de la població cel·lular segons el contingut de DNA i determinant algunes fases del cicle cel·lular. A diferència del cas anterior aquí IP s'utilitza per un marcatge global de totes les cèl·lules, per això cal permeabilitzar perquè entri el IP. El pic principal són les cèl·lules somàtiques, ja que la majoria de les cèl·lules es troben en G1 i no s'estan dividint. El pic més a la dreta d'aquest són les cèl·lules en divisió o agregats (en el nostre cas agregats principalment). Les cèl·lules situades per sota de la G1 tenen el DNA fraccionat i es relacionen amb dany al DNA característicament apoptòtic. El percentatge d'apoptosi s'estima a partir de l'àrea sota la corba en aquesta regió (Riccardi and Nicoletti, 2006).

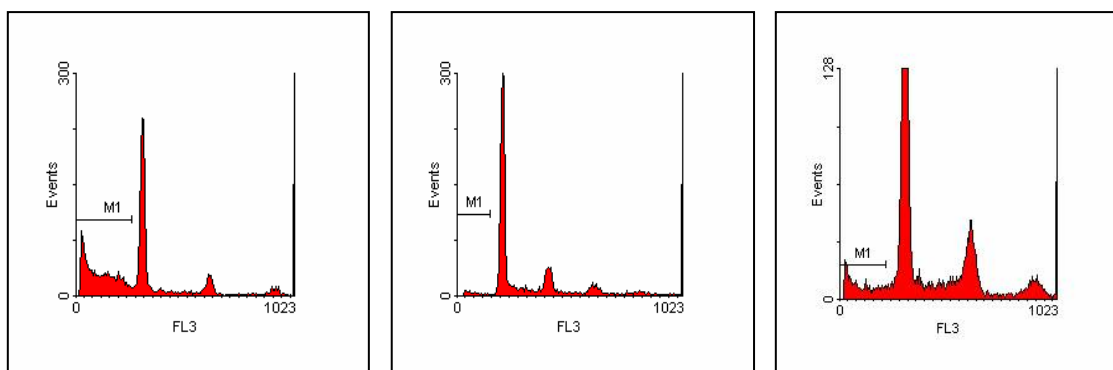


Fig 6. Resultat de l'anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux. La regió M1 és la considerada població de cèl·lules apoptòtiques. Control positiu de estaurosporina (2µM, estoc 1mM en DMSO), normòxia i A-/R+ respectivament.

Fixació de les cèl·lules amb etanol

Extracció en fred. Preparar 10 ml d'etanol 70% fred. Recollir per raspap cèl·lules en plaques petri de 6cm, centrifugar (pols) i rentar amb PBS fred. Resuspendre el pelet cel·lular 300ul de PBS amb pipeta Pasteur, és important evitar aglomerats cel·lulars. S'afegeixen 800ul de 70% etanol per a fixar les cèl·lules, es pipeteja dues vegades i es congelen a -20°C .

Marcatge amb Iodur de Propidi

Prèviament a la lectura pel citòmetre es centrifuga (pols) les cèl·lules, renten amb PBS per diluir l'etanol i després de centrifugar es resuspenen en 500µl de solució de tinció IP/Tritó/RNAsa durant 30 min. a t.a. (0.2 mg/mL RNAsa A, 0.1% tritóX100 en PBS, 20µg/mL IP). La lectura es fa amb el citometre Epics XL (Beckman-Coulter

Corporation/IZASA). El percentatge d'apoptosi s'estima a partir de l'àrea de la població subG1. (Riccardi and Nicoletti, 2006).

Solució IP/Tritó/RNAsa: A 10ml de 0.1% (v/v) Tritó X-100 en PBS, s'afegeixen 2mg de RNAsa A (DNAsa free,1007885,SIGMA, 100mg/ml) i 200 µl de Iodur de propidi 1mg/mL.

4.5.3. Mesura de l'activitat caspasa 3

La mesura de l'activitat caspasa 3 consisteix en un l'assaig fluoromètric continu basat en l'activitat caspasa 3 sobre un pèptid substrat (Ac-DEVD-AMC), que conté un motiu tetrapeptid-AMC.(Valencia and Moran, 2004). L'activitat caspasa es presenta com a increment de la fluorescència respecte la proteïna total en la mostra.

Reactius:

Tampó standard (STD): (0.2% CHAPS, 100mM/1mM HEPES-EDTA pH 7.5, 10% sacarosa, 20µM EGTA,10mM DTT,2µg/mL Aprotinina, 2µg/mL Pepstatina, 10µg/mL Leupeptina,1mM PMSF, 1mM NaF)

Digitonina: (SIGMA, D5628) stock 34.5mg/mL(28mM).

Tampó de Lisis: tampó STD amb 0.03% digitonina(0.3mg/ml). L'estoc de digitonina s'escalfa a 80°C just abans de l'ús per solubilitzar-la correctament. Afegim 30.4µl de l'estoc de digitonina a 3.5 ml de tampó STD.

Ac-DEVD-AMC: (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC ammonium salt I-1660, Bachem). Resuspenem en DMSO per tenir concentració 10mM estoc.

Extracció de mostres i lectura

Les cèl·lules es recullen per raspats de plaques de Petri de 6cm en el cas de SH-SY5Y i de 24 pous en el cultiu primari de neurones. Es centrifuguen, es renten amb PBS i lisen amb 50µL de tampó de lisis fet al moment (STD+digitonina). Es congelen les mostres (-80°C).

Assaig

Les mostres es descongelen, i soniquen. Es reserva una alíquota per la quantificació de proteïna (Bradford). Es fa tampó STD de nou.

S'afegeix el volum de mostra corresponent a 50 µg de proteïna a cada pou. S'augmenta el volum fins a 190 µl amb tampó STD i es mescla bé.

Es prepara el substrat (pèptid Ac-DEVD-AMC) per a tenir solució 500µM (20µl de l'estoc 10mM+380 µl de tampó STD). S'afegeixen 10 µl d'aquesta solució a cada pou per tal de tenir una concentració final de 25µM.

Volum final de la reacció per pou: 200µl.

S'inclouen en les proves inicials pous control:

El blanc és 200µl de tampó STD (el blanc s'inclou sempre).

El control negatiu: 190µl de tampó STD+ 10µl de substrat.

El control negatiu: 200µl incloent tampó STD+ mostra.

El control negatiu: mostra+inhibidor activitat caspasa; és 190µl tampó incloent mostra, 10µl de substrat i 1µl inhibidor. Aquest és un pèptid inhibidor del tall de caspasa3 del pèptid substrat Ac-DEVD-CHO (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde (pseudo acid) H-2496, Bachem). S'afegeix 1µl de l'estock (10mM) per tenir concentració final 50µM al volum final 200µl.

Com a control positiu es pot incloure un extracte de cèl·lules exposades a estaurosporina(2µM, estoc 1mM en DMSO 24h.).

Després d'emplenar tots els pous s'espera 5 min i s'inicia la lectura en un lector de microplaca de fluorescència (SpectraMax GeminiXS, Molecular Devices/Bionova, Madrid). Paràmetres de lectura: longitud d'excitació:360nm; emissió 460nm; 8 lectures, 300 segons entre 2 escans (llegint cada 5 min. durant 1h.), sensibilitat 2-3.

Les mesures de fluorescència s'obtenen per a longitud d'ona de 360nm (excitació) i 460 nm (emissió) cada minut durant 30 min després d'afegir el substrat. L'activitat caspasa és proporcional a l'increment de la pendent i s'expressa com a increment de fluorescència/min/mg de proteïna (Bradford). Els valors s'expressen com a percentatge del control per a cada experiment. Es calcula l'activitat respecte proteïna com a Δ fluorescència/min./mg prot.

4.5.4. Immunocitoquímica de caspasa 3 activada

La immunofluorescència permet detectar una proteïna específica mitjançant la hibridació amb un anticòs primari específic que reconeix la proteïna i un secundari conjugat a una molècula fluorescent (també pot usar-se només un primari fluorescent).

Solucions:

- Paraformaldehid al 4%
- PBS + 0,2% de Tritó X100
- PBS 1x

Fixació de les cèl·lules

A partir de les cèl·lules en cultiu, amb cura s'aspira el medi i es fa un rentat amb PBS 1X, es fixen amb 4% paraformaldehid durant 30 min. a t.a., renten amb PBS i es mantenen a 4°C fins a la incubació.

Immunocitoquímica

Les cèl·lules es permeabilitzen amb 0.2 % TritóX-100 (Sigma) en PBS durant 8 min. a t.a., es renten amb PBS i s'incuben amb solució de bloqueig que conté sèrum de l'animal en què s'ha fet l'anticòs secundari (3% sèrum de cabra en PBS) durant 1h a t.a. per evitar unions inespecífiques.

Es fa un rentat amb PBS i incubació o.n. a 4°C amb l'anticòs específic per a caspasa3 activada (cat #9661, Cell Signaling/IZASA) a 1:200 en PBS amb 1% sèrum de cabra. L'endemà es fan 2 rentats i incubació 1h. a t.a. amb anticòs secundari de cabra anti immunoglobulina de conill conjugat amb Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluït en PBS amb 1% de sèrum.

Posteriorment es fan dos rentats amb PBS i es fan fotografies de 4 camps diferents a l'atzar per a cada tractament en un microscopi invertit de fluorescència (Olympus).

El comptatge de cèl·lules positives es fracciona pel nombre de cèl·lules totals en la imatge (tenyides amb Hoescht 33342 diluït 1/100 respecte l'usat en el comptatge cel·lular per a determinar viabilitat).

4.6. Quantificació dels nivells intracel·lulars d'ATP

Els nivells intracel·lulars d'Adenosina 5'-trifosfat (ATP) es determinen usant un kit d'assaig (FL-AA, SIGMA) basat en una reacció luminiscent d'oxidació de la luciferina catalitzada per l'enzim luciferasa al consumir ATP. La primera reacció és reversible i l'equilibri tendeix a usar ATP, mentre la segona és irreversible.

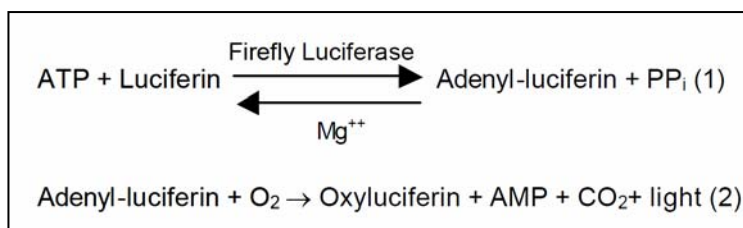


Fig 7. Reacció luminiscent en la que es basa el kit.

L'enzim i el substrat provenen del kit i l'ATP prové de la mostra. L'ATP és limitant perquè es doni la reacció, la llum emesa és proporcional a la quantitat d'ATP present.

Extracció

Els extractes s'obtenen a partir de plaques de 6cm (300.000 cèls/placa). L'extracció es realitza en fred.

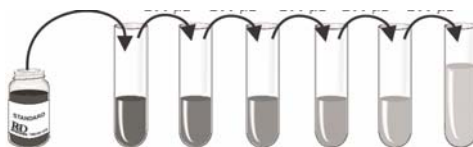
Tant per la normòxia, OD com OGD l'extracció és igual: s'agafa gran part del sobrenedant i es centrifuga 5 min a 1.000 rpm. Es recullen per rascat les cèl·lules més adherides a la placa i es centrifuguen en fred (pols). S'aspira el sobrenedant, es resuspèn

en 500µl de PBS i s'uneixen les dues fraccions per a cada mostra. Es centrifuga en fred (pols) i es resuspèn el pelet en 400 µl de tampó de lisis 1X (Somatic Cell ATP Releasing agent, SIGMA), que permeabilitza la membrana i allibera l'ATP intracel·lular. Es centrifuga en fred (pols) . Es recupera el sobrenedant i es congela (-20°) fins a fer l'assaig, el més aviat possible.

Assaig

Es descongelen les mostres i es separa una alíquota per a la quantificació de proteïna. En la realització de l'assaig es segueixen les instruccions del kit, es realitzen duplicats i una recta patró de concentració d'ATP en paral·lel, tot en gel. La luminiscència es mesura en un luminòmetre de microplaca Orion (Berthold/Labnet, Madrid). Els resultats es normalitzen per la concentració proteica.

ATP standard: Es resuspèn el vial de estoc d'ATP standard del kit en 200 µl d'aigua estèril per a tenir solució 10mM ATP. Fem una dilució 1/100 d'aquesta per a tenir 100 µM ATP a partir del qual fer dilucions seriades per a la recta patró.



Volum de dilució d'ATP	Volum d'aigua	Concentration final STD
16 µl de 100µM dilution	84 µl	100 µl 16 µM (S1)
35 µl de S1 (16 µM)	35 µl	70 µl 8 µM (S2)
25 µl de S2 (8 µM)	25 µl	50 µl 4 µM (S3)
4 µl de S2 (8 µM)	36 µl	40 µl 0.8 µM (S4)
4 µl de S3 (4 µM)	36 µl	40 µl 0.4 µM (S5)
8 µl de S4 (0.8 µM)	32 µl	40 µl 0.16 µM (S6)
4 µl de S4 (0.8 µM)	36 µl	40 µl 0.08 µM (S7)
4 µl de S5 (0.4 µM)	36 µl	40 µl 0.04 µM (S8)
4 µl de S7 (0.08 µM)	36 µl	40 µl 0.008 µM (S9)

Taula 5. Dilucions seriades per a la corba d'ATP

Una vegada estàn fetes les dilucions s'agafen 25 µl de cada dilució i s'afegeixen 175 µl de tampó SR 1X. Es fa el mateix per a les mostres: agafem 25 µl de cada mostra i afegim 175 µl de tampó SR 1X. Es fa un "blanc " amb 200µl de tampó SR 1X.

	STD:	mostra	STD:
	175 µl 1X SR.	175 µl 1X SR.	200µl 1X SR.
	+	+	
	25 µl de la dilució	25 µl de la mostra	
VF	200 µl	200 µl	200 µl

Taula 6. Volums per pou segons el tipus de mostra

Es prepara la mescla de l'assaig: es dilueix l'**ATP assay mix 25X** en el tampó **ATP assay mix dilution buffer** i es manté protegit de la llum.

Es col·loquen 100 µl de cada mescla de std, mostres i blanc en els pous corresponents d'una placa *multiwell* de 96 pous opaca. Es fan duplicats.

Es llegeix al luminòmetre de microplaca Orion (Berthold) amb el protocol: neteja del circuit amb aigua (20 aspiracions), etanol 70% (20 aspiracions) i aigua (20 aspiracions). Es fan 7 aspiracions amb el tampó d'assaig. S'inicia el programa: *preposition* 100µl, *delay* 2.15 sec, *measure* 10sec.

Es calculen a partir de la recta els pmols de ATP (presentes en els 25µl de mostra) i s'expressen com a pmols ATP/µg de proteïna (present en 25µl de mostra, calculada pel mètode Bradford). Es mostren com a percentatge del basal.

4.7. Quantificació de proteïnes per ELISA

La tècnica ELISA permet detectar i quantificar la concentració d'una proteïna determinada. S'han utilitzat diferents kits de ELISA específics per a certes proteïnes basats en el mètode d'ELISA anomenat *sandwich* de detecció colorimètrica.

Els kits incorporen una placa de 96 pous on prèviament s'ha immobilitzat un anticòs específic per la proteïna que es vol detectar. La mostra s'afegeix als pous, es fan rentats per evitar la unió inespecífica. Posteriorment s'afegeix un altre anticòs que la reconeix. El revelat es porta a terme mitjançant una reacció enzimàtica catalitzada per l'enzim unit a aquest anticòs (si aquest no porta enzim unit cal afegir un anticòs secundari que detecta l'anticòs específic contra la proteïna i fer rentats per eliminar l'excés d'anticòs secundari). S'afegeix el substrat i es mesura l'absorbància a l'espectrofotòmetre.

- Quantificació de VEGF

El VEGF secretat per les cèl·lules és quantificat mitjançant el kit Quantikine Human VEGF Immunoassay (R&D Systems /Vitro) a partir de medi de cultiu.

Després de l'anòxia es recullen 500µl de medi de cultiu de plaques de 6cm (300.000 cèl·lules) SH-SY5Y. Es centrifuguen (pols) i el sobrenedant es congela (-80°C). La

quantificació es realitza seguint les instruccions de la casa comercial, i els resultats es normalitzen pel nombre de cèl·lules i representen com a increment vs. grup control.

- Quantificació de HIF1 α

La quantificació de HIF1 α intracel·lular total es fa amb l'immunoassaig *kit two-site sandwich Surveyor IC intracel·lular Human/mouse total HIF1 α* (R&D Systems /Vitro) basat en la presència d'un anticòs específic contra HIF1 α pre-immobilitzat en la microplaca, i d'un altre anticòs biotinilat que reconeix HIF1 α .

Reactius:

Tampó de lisis complet : tampó 11 afegint inhibidors. P.ex. per a 10 mostres (100 μ l *10= 1000 μ l Volum final). Afegir a 1 ml de Tampó 11:

1ul DTT 1M

1ul PMSF 1M

2.5ul inhibidor de proteases (P2714,SIGMA) alíquota concentrada 100X . Es recomana usar un vial (100ml) per 20g d'extracte ó 10.000.000 cèl·lules/ml de tampó. La concentració mitja de proteïna en les nostres mostres és 50ug, caldria afegir 250 μ l per mostra És més pràctic treballar amb alíquotes concentrades 1000X per incloure menor volum. Per 10 mostres* 0.25ul =2.5ul.

Extracció i assaig

A partir de plaques de 6cm. (300.000 cèls SH-SY5Y) es recullen les cèl·lules per rascat, es centrifuguen (5min. 1.000rpm), es netegen amb PBS, es centrifuguen en fred (pols) i es resuspenen en 100 μ l de Tampó de lisis 11 complet. S'incuben en fred 15 min., es centrifuguen per recuperar el sobrenedant i es congelen ràpidament. (-20°C). En paral·lel, es quantifica la proteïna (Bradford)

L'assaig es realitza seguint les instruccions de la casa comercial. Es prepara una recta estandard de concentracions de HIF1 α , a partir de la que es determina la concentració de HIF1 α en cada mostra. (pg HIF1 α /mL de solució). Els valors s'expressen normalitzats per proteïna en la mostra (pgHIF1 α / μ g proteïna) (Bradford). La detecció és per mètode colorimètric d'Estreptavidina-HRP.(*Horseadish peroxidase*)

4.8. Assaig d'interacció proteïna-DNA per ELISA

L'activitat del factor de transcripció HIF1 pot estudiar-se a partir de la capacitat del factor HIF d'unir-se a DNA . Aquest assaig avalua la unió del factor a una seqüència diana (oligonucleòtid) amb el kit colorimètric *TransAm HIF-1 Transcription factor assay* (Active Motif/CondaLab). Aquest kit conté un oligonucleòtid que inclou la

seqüència HRE del gen de l'eritropoietina (EPO) immobilitzat als pous de la microplaca. Els dímers actius de HIF1 inclosos en els extractes s'uneixen específicament a l'oligonucleòtid i es detecten mitjançant l'ús d'un anticòs anti HIF1 α , i posteriorment un anticòs secundari conjugat a HRP i es quantifica per espectrofotometria.

Reactius

Solució A hipotònica:

0.5ml HEPES (stock 200mM) _____ 10 mM
1ml KCl 1 (stock 00 mM) _____ 10 mM
2 μ l EDTA (stock 500mM) _____ 0.1 mM

Solució Lysis: (del kit)

1ml de Tampó de lisis del kit
1 μ l DTT de kit
10 μ l inhib. Proteases del kit

Extracció

El protocol d'extracció es basa en les instruccions del kit amb algunes variacions. L'extracció és constantment en gel. A partir de plaques Petri de 6cm (300.000 cèl·lules SH-SY5Y) es rasquen cèl·lules en el medi amb "rasqueta". Es centrifuga 5 min a 1.000 rpm a t.a. Es resuspen el pelet en 500 μ l de PBS fred i es passa a un tub petit eppendorf. Es centrifuga (pols) en fred.

Es resuspen en 400 μ l de Solució A freda afegits gota a gota i fent copets al fons del tub amb el dit (*flicking*). (Fer previament un *flicking* sense haver resuspès, per tal de fer baixar el pellet).

S'incuba en gel aprox. 20 min , invertint el tub cada cert temps.

S'afegeixen 12 μ l 10% Igepal CA-630 (altrament dit NP40, SIGMA). Invertir immediatament i centrifugar 1 minut a 11.000 g a 4°C.

Es descarta el sobrenedant. Es resuspen el pelet nuclear en 50 μ l de *Complete Lysis Buffer* i mantenir el tub en gel 30 minuts en moviment.

Es centrifuga 10 min. a 14.000 g 4°C i s'agafa el sobrenadant com a extracte nuclear i es congela (-80°C). Agafar 3 μ l per quantificació proteica (Bradford) i evitar cicles de congelació/descongelació.

Assaig

L'assaig es porta a terme seguint les instruccions de la casa comercial, i els resultats es normalitzen per concentració de proteïna i s'expressen com increment respecte el control.

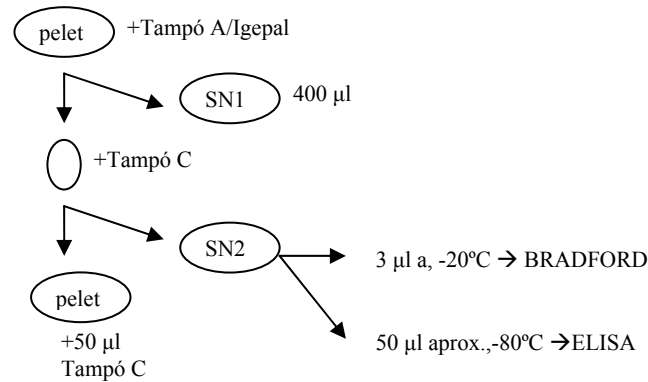


Fig8. Esquema de l'extracció

4.9. Estudi de l'activitat transcripcional: Assaig luciferasa

L'activitat transcripcional pot ser mesurada utilitzant una proteïna *reporter*. Es transfecta transitòriament cèl·lules SH-SY5Y amb un plàsmid cedit pel Dr. R Bartrons (Obach et al., 2004) que expressa l'enzim luciferasa (*firefly luciferase*) sota el control del promotor de c-fos i una seqüència de 29pb originària del gen de *PFKFB3*, que conté una zona HRE i per tant és diana de HIF1 (veure apartat "Adaptació a hipòxia", Introducció). S'inclouen vectors control:

Vector que només conté el promotor c-fos però no la seqüència HRE (cfos)

Vector que conté c-fos i la seqüència HRE mutada (HIFm)

Cèl·lules sense transfectar (NT, *No transfectades*)

Es cotransfecta amb un plàsmid d'expressió constitutiva (pRL-CMV, Promega) codificant per a una altra luciferasa (de *Renilla reniformis*, Promega) per normalitzar l'eficiència de transfecció.

Cèl·lules SH-SY5Y sembrades en placa *multiwell* de 24 pous, 40.000 cèl·lules per pou i diferenciades amb RA.

Transfecció i experiment

El quart dia de tractament de RA previament al canvi de medi es transfecta 0.5-1µg de DNA (9 parts de luciferasa *firefly* per 1 part de *Renilla*) amb Superfect (Qiagen/Izasa).

Preparam les barreges de transfecció DNA i medi (F-12) (veure taula):

- NT
- Basal (cfos)
- HIF (HRE)
- HIFm (mutHRE)

Afegim Superfect a la barreja i vortexem breument (segons). Deixem la mescla 10 min. a t.a.

Afegim el volum adequat de medi comple (amb FBS) a les mescles per tenir el volum final adequat i a tots els tractaments per igual.

Rotulem i rentem amb PBS les cèl·lules.

Afegim el volum de transfecció als pous i mantenim el medi de transfecció 3h. a les cèl·lules a l'incubador 37°C 5%CO₂.

Passades les 3h fem tres rentats amb PBS i dos amb medi de creixement. Després s'afegeix el volum apropiat de medi de diferenciació (incloent RA) i es deixa durant els 2 dies següents. Posteriorment es fan els experiments d'anòxia amb 500µl de medi en cada pou.

NT (X4.5 pous)	NT per pou	Basal, HIF, HIFm	Per pou
2.25µl Bluescript (µg/µl)	0.5µl Bluescript (µg/µl)	2.025µl plasmid DNA (µg/µl)	0.45µl plasmid DNA (µg/µl)
		2.25µl Renilla (100ng/ µl)	0.5µl Renilla (100ng/ µl)
279 µl F-12	62 µl F-12	276.98 µl F-12	61.55 µl F-12
11.25µl Superfect	2.5µl Superfect	11.25µl Superfect	2.5µl Superfect
VF=292.5 µl	VF=65 µl	VF=292.5 µl	VF=65 µl
Vortex, 10 min. t.a.			
1575 µl medi de creix. Complet	350 µl medi de creix. Complet	1575 µl medi de creix. Complet	350 µl medi de creix. Complet
1867.5µl VF (4.5pous)	415 µl per pou	1867.5µl VF (4.5pous)	415 µl per pou

Anòxia					Normòxia				
Basal	HIF	HIFm	NT		Basal	HIF	HIFm	NT	
-	-	-	-		+	+	+	+	
+	+	+	+		+	+	+	+	

Fig 9. Taula amb les barreges de transfecció calculades pels 4 pous corresponents. Esquema de les dues plaques i els tractaments: Esquema de plaques en anòxia amb el plàsmid transfectat en cada cas i la placa control (Normòxia). La presència o no de glucosa en el medi ve indicada pel signe + i – respectivament.

Extracció i lectura

Extracció d'acord amb les instruccions del kit Dual-Glo (Promega). En la placa de normòxia i en tractament de OD s'aspira el medi, es renta amb PBS i afegim 100 µl del tampó del kit *Passive Lysis Buffer* 1X. En el cas de OGD es recullen les cèl·lules per pipeteig, es centrifuguen (pols) en fred, i es renten amb PBS, es centrifuguen i es resuspèn el pelet cel·lular amb 100 µl del tampó. Els extractes es congelen fins a l'assaig, el més ràpidament possible (-20°C).

La lectura es realitza per a 20 µl de la mostra en un luminòmetre de microplaca Orion (Berthold/Labnet), primer afegint el substrat LARII i llegint per luciferasa i després afegint Stop&glo i llegint per Renilla. Per a cada mostra el valor de la luciferasa es normalitza pel de la renilla. Per a cada tractament, els valors *luciferasa/renilla* es normalitzen pel valor *luciferasa/renilla* del basal.

4.10. Estudi de l'activitat del proteasoma

L'activitat del proteasoma s'ha avaluat mitjançant transfectants estables de cèl·lules SH-SY5Y per a una proteïna reporter de fusió (*Enhanced Green Fluorescence Protein, EGFP*) que conté una ubiquitina unida (ub), que facilita la unió de més ubiquitines i per tant si el proteasoma està actiu la degrada i no es detecta. En canvi si el proteasoma no funciona la proteïna no es degrada i es detecta. Es sotmet cèl·lules SH-SY5Y a OD i OGD. La detecció es realitza per western blot usant un anticòs contra la proteïna verda (GFP).

Els plàsmids d'expressió de la proteïna de fusió Ub-G76V-EGFP (Addgene plasmid 11941) i la Ub-M-EGFP (Addgene plasmid 11938) van ser obtinguts de N. Dantuma

(Dantuma et al., 2000) a través de Addgene. La proteïna de fusió Ub-G76V-EGFP (UbG76) conté la proteïna EGFP fusionada a una ubiquitina, amb una mutació a la zona d'unió entre ub i EGFP que fa que no pugui tallar-se la ub. Així doncs, UBG76 sempre té una ub unida, que facilita la unió de més ub i la posterior degradació. Aquesta proteïna actua com a reporter, ja que en condicions de proteasoma actiu i capaç de degradar aquesta proteïna serà degradada i per tant no es detectarà. La proteïna Ub-M-EGFP (UbM) s'usa com a control d'especificitat de la detecció. En la zona d'unió entre ubiquitina i EGFP conté una seqüència diana per proteases cel·lulars, que tallen i separen la ub de la proteïna EGFP. La UbM té una expressió basal constitutiva que no ve influïda per l'activitat del proteasoma. Com a control negatiu de l'activitat del proteasoma s'afegeix MG132 (10µM) durant diferents períodes de temps en normòxia, i veiem expressió de la proteïna.

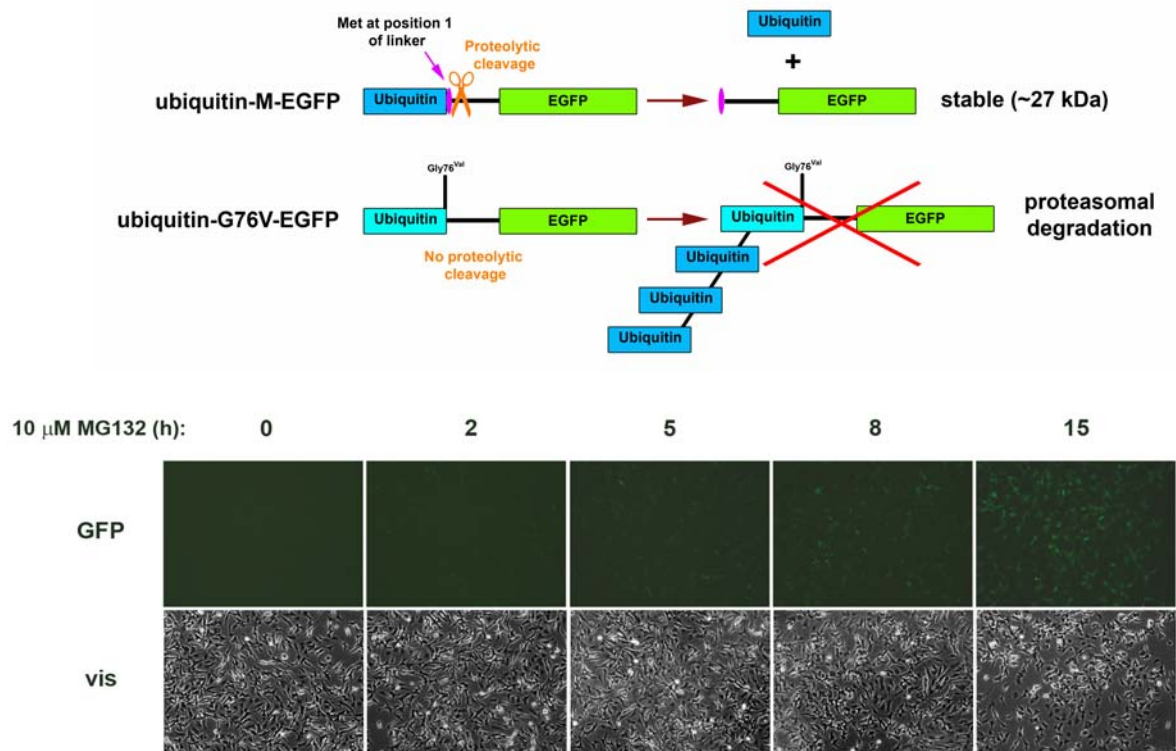


Fig 10. Esquema de l'estructura de la proteïna reporter UbG76 i la control UbM.

Expressió de la proteïna amb la inhibició del proteasoma (MG132).

Transfecció estable

Es sembren un milió de cèl·lules SH-SY5Y en una placa de petri de 10cm sense presència de RA. Es transfecten amb Superfect, tal com s'indica en l'apartat anterior, en aquest cas amb 5µg de DNA, i 5µl de Superfect per placa. En aquest cas la mescla es:

5 µl de DNA (1 µg/ µl) d'un plàsmid o altre.

295 µl F12

25 µl de Superfect

Es deixa 10 min. a t.a.

S'afegeix a la barreja 3ml. de medi complet de creixement.

Es fa un rentat amb PBS de les cèl·lules, i s'afegeix tot el volum de la barreja a la placa.

L'endemà es fan rentats i es canvia el medi per medi de creixement fresc.

Tres dies després s'inicia la selecció amb G418 (concentració final 400µg/ml).

Passats deu dies es comencen a detectar clons, que es seleccionen amb *cilindres*, i es sembren per separat. A partir d'aquí es treballa com en el cas de la línia mare, mantenint flascons i sembrant en placa per experiments.

Experiment i extracció

Al 5è dia de presència de RA fem l'experiment d'anòxia. Es fan els tractaments de OD, OGD i normòxia. Es fa un control positiu de l'expressió de la proteïna reporter (control negatiu d'activitat del proteasoma) incloent MG132 a l'inici de la OD, OGD i normòxia (10µM).

L'extracció és tal com descrita per als extractes totals per a Western amb tampó de càrrega incloent Blau de Bromofenol: En els tractaments de normòxia i OD aspirem el medi de la placa, rentem amb PBS i resuspenem amb 250µl de LSB 1X. En el cas de OGD recollim per rascat el medi i les cèl·lules, fem centrifugació (pols) netegem amb PBS i resuspenem amb 250µl LSB 1X. En els dos casos filtrem i congelem les mostres per assajar-les per western blot usant un anticòs antiGFP (veure llista anticòssos). Carregarem 10-20µl de mostra.

4.11. Determinació dels metabòlits del TCA

La determinació intracel·lular de metabòlits com alfacetoglutarat, succinat i fumarat es realitza per cromatografia de gasos i espectrometria de masses (GC-MS) segons adaptació d'un protocol optimitzat de l'extracció de cetoàcids (Ribes et al., 1992; Tanaka et al., 1980)

Experiment i extracció

Cèl·lules SH-SY5Y sembrades en plaques Petri 10cm. 3.000.000 cèl·lules per placa, diferenciades i sotmeses a anòxia segons el protocol. En iniciar la reoxigenació s'afegeixen 2ml del mateix tipus de medi de l'anòxia i es deixen reoxigenar durant 1h. (OD+R1h, OGD+R1h).

En tots els tractaments recollim tot el medi i les cèl·lules per rascat, centrifuguem 5min. 1000rpm 4°C, rentem amb PBS fred i aprofitem per unir tres plaques pel mateix tractament.

Resuspenem en 500µl d'aigua desionitzada. Reservem una alíquota per quantificar proteïna (10-20µl) (Assaig de BCA (Thermo Scientific Cultek)) i ho congelem tot.

Reactius

Undecanoic acid(FLUKA)

Diethyleter (Merk)

Ethylacetate (JT Baker/ Serviquimia)

Timetilsilil (anomenat també BSTFA) (SIGMA)

Assaig

S'optimitza el protocol d'extracció de cetoàcids: doble extracció de dietilèter i doble extracció d'etilacetat. Condicions: standard (undecanoic acid) 6µl, 75µl BSTFA, i punxem 2µl.

Descongelem la mostra i agafem 500µl i col·loquem al tub d'extracció (vermell llarg)

Afegim

+ 1.500µl H₂O miliQ

+1.000µl Hidroxid de sodi 8M (mirar que pH sigui bàsic)

+1.000µl Hidroxilamina (preparada abans de començar 250mg/10ml H₂O miliQ)

Tot a bany sec 60°C 30 min.

Mentrestant afegim 6µl de l'st. (undecanoic acid) al vial buit per derivatitzar (negre)

Treure del bany i deixar refredar.

Iniciar extracció. Afegim en aquest ordre:

+ 1.000µl HCL 6N.

+ 2.000µl dietilèter (pipetejar amunt i avall unes vegades per confirmar que agafem el volum que pertoca, és molt viscos) Mirar que tap estigui ben tapat.

10 min. en agitació

Centrifugar 2.500rpm. 10 min t.a.

Agafar fase superior amb pasteur i traspasar a tub de derivatització

Mentre fem 2^a extracció de éter podem evaporar el que hem tret de la 1^a d'éter

Tornem a fer extracció de dietilèter

+ 2.000µl dietilèter , moviment 10 min., centrifugar, traspasar sobrenedant.

Mentre fem 1^a extracció de etilacetat podem evaporar el que hem tret de la 1^a d'èter.

Afegir

+ 2.000µl etilacetat (pipetejar amunt i avall unes vegades per mullar parets de la punta i confirmar que agafem el volum que pertoca, és molt viscos) Mirar que tap estigui ben tapat.

Agitació 10 min.

Centrifugar 10 min t.a.2.500rpm.

Agafar fase superior amb pasteur i traspasar a tub de derivatització

Mentre fem 2^a extracció de etilacetat podem evaporar el que hem tret de la 1^a etilacetat

Tornem a fer extracció de etilacetat.

+ 2.000µl etilacetat, moviment 10 min., centrifugar, traspasar sobrenedant

Ens assegurem que s'hagin evaporat correctament i no quedi cap gota.

Derivatitzar

Afegim 75µl BSTFA i fem vortex breu.

30 min a 60°C bany séc.

Refredar a la pica, passar a vial final i tapar-los i congelar a -20°C fins a punxar les mostres a la màquina (2µl) usat un mètode splitless i rampa de pressions. Els resultats s'analitzen amb el software ChemStation GC/MSD. L'àrea del pic per a cada àcid es normalitza per l'estandard (undecanoic) i es fracciona per la proteïna en la mostra.

4.12. Determinació de la condició d'hipòxia per detecció d'adductes proteïna-pimonidazol

El kit Hypoxyprobe-1 plus (HP2-100 Chemicon) es basa en la detecció de adductes que forma el pimonidazol amb les proteïnes en condicions de poca concentració d'oxigen (menor de 10 mmHg) per a determinar que s'han donat condicions d'hipòxia. La detecció dels adductes de pimonidazol es pot fer per microscopia i per citometria de flux amb anticòs fluorescent contra aquests compostos.

Reactius

Pimonidazol Hypoxyprobe Plus kit Chemicon HP2-100: 100mg resuspès en 2ml de salí (NaCl 0.9%) (solució stock 170mM)

Solució Bloqueig : PBS , 0.1% tritó, 5% llet, 4% FBS.

Experiment

S'afegeix el pimonidazol abans de l'anòxia: 1.32 µl de Pimonidazol en 3ml de medi en plaques de 6cm. (75 µM)

Es sotmet les cèl·lules a anòxia. Posteriorment es fa l'extracció i es fixa en gel tal com en l'estudi del cycle cel·lular per citometria: es recullen per raspats les cèl·lules en plaques petri de 6cm, es centrifuguen (pols) i renten amb PBS fred. Es resuspen el pelet cel·lular amb 300 µl de PBS amb pipeta Pasteur, és important evitar aglomerats cel·lulars. S'afegeixen 800 µl d'etanol 70% per a fixar les cèl·lules, es pipeteja dues vegades i es congelen a -20°C

Lectura Citometre de flux.

Protocol de bloqueig i incubació basat en (Durand and Raleigh, 1998; Papandreou et al., 2006; Vordermark and Brown, 2003) amb modificacions.

Es descongelen les mostres i es centrifuguen (pols).

S'incuben en 100 µl de solució de bloqueig tota la nit en agitació orbital a 4°C. (tubs eppendorf).

L'endemà s'incuben 2h (es pot fer 1h si cal) amb 50 µl de solució de l'anticòs monoclonal de ratolí conjugat amb FITC que detecta els adductes del producte amb les proteïnes (1:25 en solució de bloqueig sense llet) en agitació orbital a 4°C.

Es fan dos rentats amb 500 µl de solució de bloqueig en agitació orbital a 4°C .

Es renten amb 500 µl de PBS.

Es resuspenen amb 500 µl de PBS. Es protegeix de la llum. Llegim al citometre Coulter Epics XL (Bechman-Coulter Corporation/IZASA) intensitat de FITC detectada en FL1 (florescència verda)

4.13. Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística es fa amb el software GraphPad Prism (GraphPadSoftware) segons s'indiqui: Test t-Student; one sample t-test; one-way ANOVA, seguit del post test Bonferroni's Multiple Comparison test; test Krustall-Wallis seguit de Dunn's multiple test.

RESULTATS

5. RESULTATS:

Els resultats d'aquesta tesi es presenten en format de dos articles:

Article 1

Glucose promotes caspase-dependent delayed cell death after a transient episode of oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells.

Anna Serra-Pérez, Ester Verdaguer, Anna M. Planas and Tomàs Santalucía. Journal of Neurochemistry, 2008; 106:1237-1247

Article 2

Extended ischemia prevents HIF1 α degradation at reoxygenation by impairing prolyl-hydroxylation: Role of Krebs cycle metabolites

Anna Serra-Pérez, Anna M. Planas Analía Núñez-O'Mara, Edurne Berra, Judit García-Villoria, Antonia Ribes, and Tomàs Santalucía. J Biol Chem 2010 Apr 5 (Article acceptat, publicació electrònica pendent d'impressió)

RESUM DELS RESULTATS

1. Article 1

Glucose promotes caspase-dependent delayed cell death after a transient episode of oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells.

Anna Serra-Pérez, Ester Verdaguer, Anna M. Planas and Tomàs Santalucía. *Journal of Neurochemistry*, 2008; 106:1237-1247

En aquest treball s'estudia la mort deguda a la privació d'oxigen i glucosa i la posterior reoxigenació en un model d'isquèmia *in vitro* en cèl·lules SH-SY5Y diferenciades. Són necessàries anòxies prolongades per observar un efecte en aquest model. Mentre la privació exclusiva de glucosa (OD) indueix una baixa mortalitat, que no s'altera després de la reoxigenació, la privació conjunta d'oxigen i glucosa (OGD) indueix major mortalitat, que incrementa durant la reoxigenació posterior, essent significativament més gran quan aquesta és en presència de glucosa (A-/R+). La OGD indueix alliberament de factors proapoptòtics mitocondrials com AIF i citocrom c, no obstant la mortalitat en finalitzar l'OGD i en la reoxigenació sense presència de glucosa és principalment necròtica. En canvi, la mort induïda per la presència de glucosa en la reoxigenació, té un component d'activació de caspases i pot evitar-se amb la inhibició de l'activitat caspasa, tot i existir una mortalitat basal que es reverteix amb l'inhibició de calpaïna.

La mort dependent de caspases activada per la presència de la glucosa en la reoxigenació també es detecta en cultius primaris neuronals sotmesos a OGD.

Els nivells intracel·lulars d'ATP es redueixen només la meitat després de la OD però la seva caiguda és molt major després de la OGD, i es recuperen en la reoxigenació, significativament més ràpidament en presència de glucosa. Aquest fet pot ser el condicionant per a l'activació diferencial de les caspases tot i l'alliberament comú de factors proapoptòtics en acabar l'OGD.

Glucose promotes caspase-dependent delayed cell death after a transient episode of oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells

Anna Serra-Pérez, Ester Verdaguer, Anna M. Planas and Tomàs Santalucía

Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institute of Biomedical Research of Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

Abstract

Brain ischemia causes neuronal cell death by several mechanisms involving necrotic and apoptotic processes. The contributions of each process depend on conditions such as the severity and duration of ischemia, and the availability of ATP. We examined whether glucose affected the development of apoptosis after transient ischemia, and whether this was sensitive to caspase inhibition. Retinoic acid-differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells were subjected to oxygen and glucose deprivation for 15 h followed by various periods of reoxygenation in either the presence or absence of glucose. Oxygen and glucose deprivation induced cell death in the hours following reoxygenation, as detected by propidium iodide staining. At the end of the period of oxygen and glucose deprivation, both cytochrome c and apoptosis-inducing factor translocated from mitochondria to cytosol. Reoxy-

genation in the presence of glucose accelerated cell death, and enhanced caspase-3 activity and apoptosis. The glucose-dependent increase in apoptosis was prevented by treatment with the caspase inhibitor zVAD-fmk, but not with calpeptin, a calpain inhibitor. Nevertheless, both zVAD-fmk and calpeptin decreased cell death in the glucose-treated group. ATP levels dropped dramatically after oxygen and glucose deprivation, but recovered steadily thereafter, and were significantly higher at 6 h of reoxygenation in the glucose-treated group. This indicates that energy recovery may promote the glucose-dependent cell death. We conclude that glucose favours the development of caspase-dependent apoptosis during reoxygenation following oxygen and glucose deprivation.

Keywords: apoptosis, calpain, caspases, glucose, ischemia, SH-SY5Y.

J. Neurochem. (2008) **106**, 1237–1247.

Stroke is one of the main causes of death and disability in the western world. The mechanisms underlying neuronal cell death after brain ischemia are complex as it depends on multiple factors and appears in a variety of forms (Dirnagl *et al.* 1999). Although it is recognised that delayed neuronal death contributes to the pathological process (Kirino 2000; Culmsee *et al.* 2005; Rojas *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2006), the molecular mechanisms are not fully understood. Delayed neuronal death includes the development of apoptotic and necrotic processes (Li *et al.* 1995; Snider *et al.* 1999; Ferrer and Planas 2003). The specific contributions of these processes to brain damage depend on certain factors, such as the type of ischemia, its severity, the region affected (Kametsu *et al.* 2003), and possibly other factors that have not yet been identified.

The presence of apoptotic cell death after brain ischemia has been described in the penumbral region (Ferrer and Planas 2003; Ferrer *et al.* 2003), in which blood flow is only partially impaired (Hossmann 1994), tissue ATP levels are maintained

above a critical threshold (Hata *et al.* 2000), and tissue is at risk of developing neuronal death (Kidwell *et al.* 2004). This region may steadily join the irreversibly damaged area, which contributes to the expansion of infarction. Ischemia followed by reperfusion may induce apoptosis, and the contribution of

Received December 23, 2007; revised manuscript received April 30, 2008; accepted May 1, 2008.

Address correspondence and reprint requests to Tomàs Santalucía, Institute of Biomedical Research of Barcelona (IIBB-CSIC/IDIBAPS), Rosselló 161, 6th floor, E-08036 Barcelona, Spain.

E-mail: tsafat@iibb.csic.es

Abbreviations used: AIF, apoptosis-inducing factor; APAF, apoptosis protease-activating factor-1; DIV, days *in vitro*; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DTT, dithiothreitol; Hsp70, heat-shock protein 70; OGD, oxygen and glucose deprivation; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; RA, all-trans-retinoic acid; RPMI, Roswell Park Memorial Institute medium 1640; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; SH, SH-SY5Y human neuroblastoma cell line; VDAC, voltage-dependent anion channel; zVAD-fmk, Z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluoromethylketone.

apoptosis to ischemic damage has been demonstrated by the protection exerted by caspase inhibitors (Endres *et al.* 1998; Fink *et al.* 1998) and by the identification of other (caspase-related and non-related) relevant apoptotic mediators (Yin *et al.* 2002; Cao *et al.* 2003; Ferrer and Planas 2003; Ferrer *et al.* 2003; Plesnila *et al.* 2004; Culmsee *et al.* 2005). Apoptosis has also been identified in peri-infarction areas of the human brain after stroke (Sairanen *et al.* 2006).

Apoptosis is an energy-dependent process that needs the development and execution of a cell death programme (Alison and Sarraf 1992). For this reason, the availability of energy substrates might condition the type of cell death (Nicotera *et al.* 1998). Indeed, high glucose induces a switch from necrosis to apoptosis (Fujita and Ueda 2003; Ueda and Fujita 2004), whereas ATP depletion has the opposite effect (Eguchi *et al.* 1997). Here we sought to evaluate whether glucose availability and ATP level after a transient period of ischemia affected the development of apoptotic cell death, and whether this type of death could be blocked by caspase inhibition. We developed a model of delayed cell death in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells transiently exposed to a period of oxygen and glucose deprivation (OGD) and then reoxygenated either in the presence or in the absence of glucose. Our results show that glucose accelerates cell death after ischemia by promoting caspase-dependent apoptosis.

Materials and Methods

Materials

Most chemicals used were from SIGMA. All-*trans*-retinoic acid (RA) was purchased from Calbiochem/Bionova (Madrid, Spain). zVAD-fmk and calpeptin were from Bachem (Weil am Rhein, Germany), and were dissolved in dimethyl sulfoxide. Hoechst 33342 and cell culture reagents were purchased from Invitrogen (Barcelona, Spain).

Cell culture

SH-SY5Y (SH) human neuroblastoma cells were generously provided by Dr. Coral Sanfeliu (IIBB-CSIC/IDIBAPS). They were grown in a mixture (1 : 1) of MEM: Ham's F-12 media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 100 µM MEM non-essential amino acids (growth medium). The cells were kept at 37°C and 5%CO₂. SH cells were differentiated with 10 µM RA in growth medium for 5 days prior to performing experiments, as described elsewhere (Pahlman *et al.* 1984). Fresh medium containing RA was fed after 2–3 days of differentiation.

Primary cultures of cortical neurons were prepared from frontal/parietal cortex of Wistar rats (gestational day 18) as described previously (Petegnief *et al.* 2001). Animal handling was performed according to procedures approved by the University of Barcelona animal experimentation ethics committee, which conform governmental regulations. Tissue sections were pooled in ice-cold DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco invitrogen), and then dissociated by treatment with trypsin/EDTA (0.05%/0.53 mM) in

the presence of DNase (200 U/mL) and by careful triturating. Subsequent to centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was dispersed in a 1 : 1 mixture of DMEM/F-12/glutamax, 10% FBS, 50 µg/mL gentamycin (50 mg/mL), and 36 mM D-glucose. The cell suspension was plated on poly-L-lysine-coated (25 µg/mL) culture dishes with a density of 0.5×10^6 cells/mL. Cells were maintained in culture up to 14 days at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air. The culture medium was replaced on 7 and 10 DIV. To prevent proliferation of non-neuronal cells 6 µM cytosine-araboside (Sigma, Madrid, Spain) was added on DIV 4, and 3 µM on 7 and 10 DIV.

Oxygen and glucose deprivation plus reoxygenation experiments

SH cells were seeded in six cm Petri dishes at 3×10^5 cells per dish in growth medium supplemented with 10 µM RA, as described above. On the fifth day of differentiation, cells were assigned to one of three groups, namely A+/R+, A-/R-, and A-/R+ (see Fig. 1a), where the + or - sign refers to the presence or absence of glucose during the anoxia (A) and reoxygenation (R) stages of the experiments, respectively. The growth medium containing RA was aspirated, cells were briefly washed once in either glucose-containing (11 mM, for the A+ group) or glucose-free (for the A-groups) Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium supplemented with 1% horse serum and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin), and fed again with fresh medium (3 mL) immediately before anoxia. This state was achieved by continuously flushing airtight Perspex hypoxia chambers containing the dishes, with a humidified mixture of 95% N₂ and 5% CO₂ inside an incubator set at 37°C. Cells were kept for 15 h under these conditions in the experiments shown below. At the end of this period, cells were removed from the hypoxia chamber to start the reoxygenation phase, and immediately fed with 1 mL of glucose-free RPMI medium (A-/R-), 1 mL of glucose-containing RPMI medium (A+/R+) or 1 mL of the RPMI-based medium containing 44 mM glucose (final concentration in cells: 11 mM; A-/R+). Cells were subsequently incubated at the atmospheric oxygen concentration for different periods of time, as indicated.

In the OGD experiments carried on primary cultures of neurons, 0.5×10^6 cells per well were seeded on 24-well plates and maintained for 14 days in culture, as described above. Prior to the OGD experiment, media on the wells was replaced by D-glucose-free DMEM medium supplemented with 25 mM L-glucose, 15 mM HEPES pH 7.4 and B27 supplement (1 : 50 dilution; Invitrogen, Barcelona, Spain). Plates were incubated in a GalaxyR (RSBiotech/Cultek, Madrid, Spain) hypoxia incubator set at 0.6% O₂ for 1 h at 37°C. At the end of this period, cells were removed from the hypoxia incubator and media on the wells was replaced by DMEM medium containing 50 µg mL⁻¹ gentamycin, 10% FBS, 15 mM HEPES pH 7.4 and B27 supplement (1 : 50 dilution), supplemented with either 25 mM L-glucose (A-/R- group) or 25 mM D-glucose (A-/R+ group). Cells were incubated at 37°C for 6 h in a standard incubator, at the atmospheric oxygen concentration.

Quantitation of cell death

Cell death induced by OGD plus reoxygenation was quantitated in micrographs taken at the times indicated, after live staining with propidium iodide (PI, stains dead cells only) and cell-permeable Hoechst 33342 (stains all cells). PI and Hoechst 33342 were added

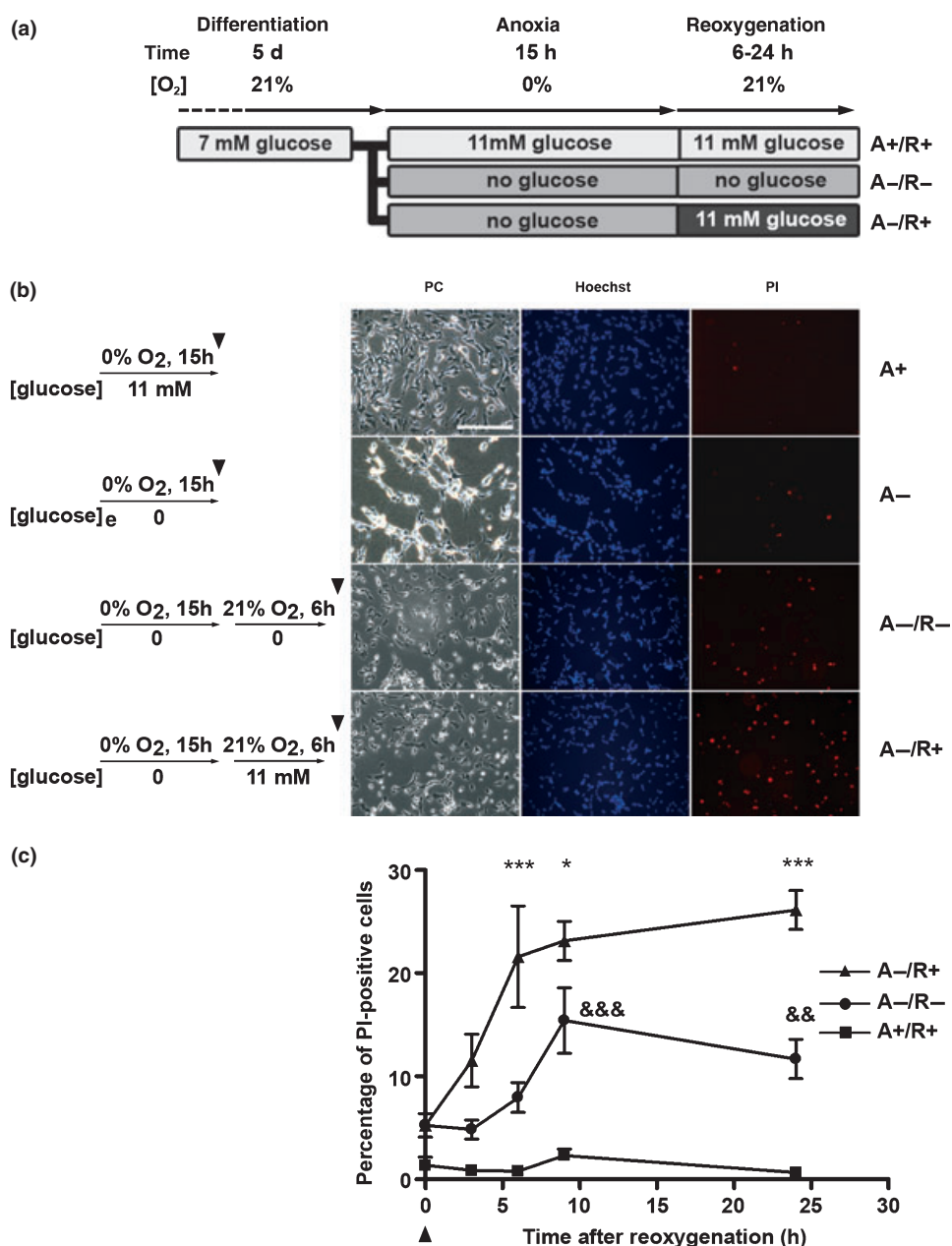


Fig. 1 OGD induces delayed cell death in RA-differentiated SH cells, which is accelerated by the presence of glucose during reoxygenation. (a) Diagram of the experimental set-up. All cells used were differentiated for 5 days in growth medium supplemented with 10 μ M RA. Before anoxia, the growth medium was replaced with either glucose-free (A-/R- and A-/R+ groups) or glucose-containing (A+/R+) RPMI medium plus 1% horse serum. After completion of the 15 h-OGD, a one-third volume of complete RPMI medium containing a 4-fold concentration of the standard concentration of glucose was added to the existing media in the plates of the A-/R+ group. The cells in the A-/R- and A+/R+ groups received an equivalent volume of glucose-free or standard RPMI media, respectively. Cells were further incubated under normoxic conditions for different lengths of time (reoxygenation). (b) Micrographs of cells were taken at the end of the indicated treatments (arrowheads) after live staining with cell-permeable Hoechst

33342 and propidium iodide (PI, see Methods), in order to detect all cells (Hoechst 33342) and those dead among them (PI-positive). Phase contrast micrographs of the same fields are included for comparisons of cell shape between the different treatments (PC). Bar = 300 μ m. (c) Cells were subjected to 15 h of anoxia followed by reoxygenation, as described in panel (a). Cells were divided into three groups according to the presence of glucose in the medium during anoxia and/or reoxygenation. Micrographs were taken at different times of reoxygenation after live staining (see above), and the percentage of PI-positive cells under each condition was estimated from these (see Methods). Data are the average of at least three experiments \pm SEM, and were analysed by two-way ANOVA (by condition and time) followed by Bonferroni's test. A-/R+ vs. A-/R-: * p < 0.05; *** p < 0.001; A-/R- vs. A+/R+: && p < 0.01; &&& p < 0.001.

to the reoxygenation medium at a final concentration of 250 ng/mL and 2.5 µg/mL, respectively. Micrographs of three to six random fields per dish were obtained in an Olympus IX70 fluorescence inverted- microscope (Barcelona, Spain) with the appropriate filter sets for PI and Hoechst 33342. PI- and Hoechst 33342-stained nuclei were counted on micrographs by using analySIS software (Olympus, Barcelona, Spain), and the percentage of death was calculated by dividing the number of PI-positive nuclei by the total number of nuclei (Hoechst-positive) for each micrograph.

Sub-cellular fractionation

Cytoplasmic and mitochondrial fractions were prepared from RA-differentiated SH cells treated as indicated by a modification of existing methods (Ferrer *et al.* 2003; Liang *et al.* 2003). Briefly, 6×10^6 SH cells seeded on two 10-cm Petri dishes per experimental condition were scraped into a small volume of culture medium and collected by centrifugation. The cell pellet was briefly washed by resuspension in cold phosphate-buffered saline (PBS) and spun again.

After the cells were resuspended in 300 µL of lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 5 µg/mL pepstatin) (Ferrer *et al.* 2003), they were mechanically disrupted in a 1.5 mL-centrifuge tube with 20 strokes of a conical glass pestle. This procedure resulted in the lysis of more than 80% of the cells (data not shown). The cell homogenate was centrifuged at 800 g for 10 min at 4°C. The pellet was saved as a nucleus-enriched fraction, and the supernatant was further centrifuged for 15 min at 10 000 g. The resulting pellet and supernatant were saved as mitochondrial and crude cytoplasmic fractions, respectively. The nuclear and mitochondrial pellets were resuspended in lysis buffer, and all fractions were stored at -20°C until used. The purity of the mitochondrial and cytoplasmic fractions was tested by Western blotting for known markers (see Fig. 2). Protein content in each cellular fraction was quantitated with Bradford's assay (Bio-Rad laboratories, Barcelona, Spain).

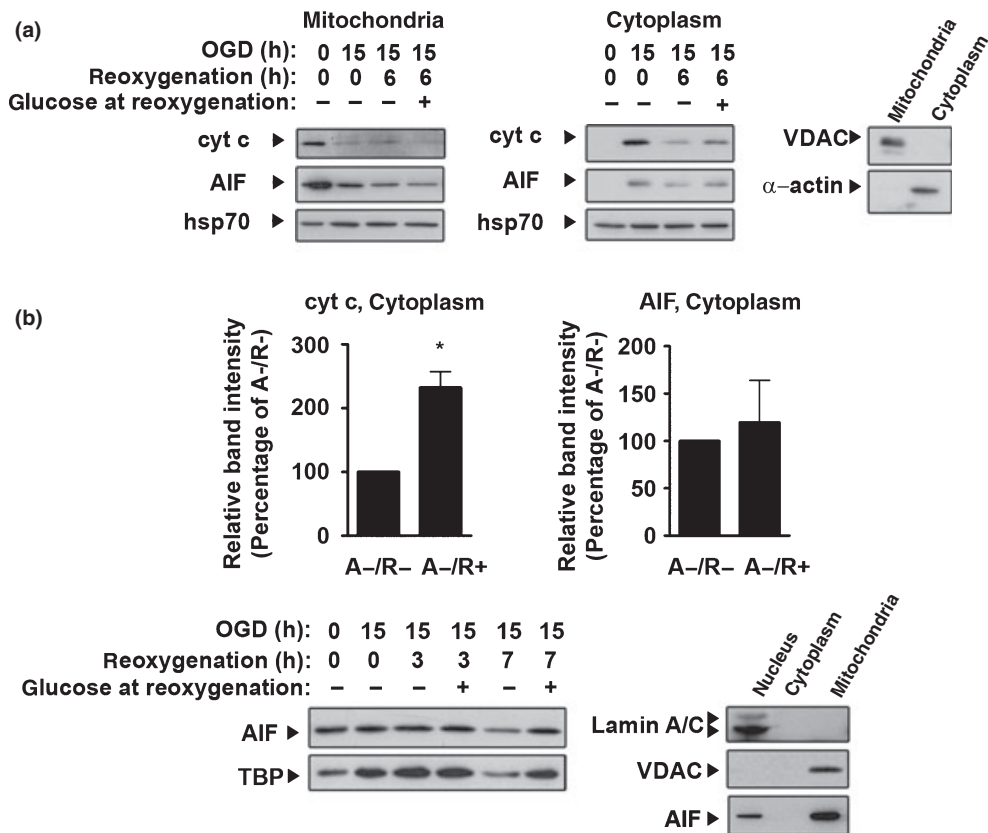


Fig. 2 OGD induces the release of cytochrome c and AIF from mitochondria. (a) Expression of cytochrome c and AIF in mitochondrial (upper left panel) and cytoplasmic (upper centre panel) fractions obtained from cells subjected to treatments involving OGD and reoxygenation, as indicated. Hsp70 expression on the same samples is included as a loading control. The mitochondrial and cytoplasmic fractions were probed for VDAC and α-actin in order to validate our fractionation method (upper right panel). Densitometry of the cytosolic abundance of cytochrome c (lower left panel) and AIF (lower right panel) at 6 h of reoxygenation in the presence (A-/R+) or absence (A-/R-) of

glucose was analysed. Data were normalised by the expression of Hsp70, expressed as percentage of the A-/R- group, and shown as the average ± SEM of three experiments. Data were analysed by one-sample *t*-test. **p* < 0.05. (b) Expression levels of AIF in nuclear fractions prepared from SH cells subjected to OGD and reoxygenation, as indicated. The same blot was subsequently probed with an antibody against TATA-binding protein to check the amount of protein loading (left panel). Our nuclear fractionation method was validated in control samples by probing for the expression of Lamin A/C and VDAC. The relative abundance of AIF in the same samples was also analysed (right panel).

Total cell extracts

Full-length α II-spectrin and its cleavage products were detected by Western blotting performed on total cell extracts. These were prepared from 3×10^5 RA-differentiated SH cells, seeded on 6 cm Petri dishes. After a brief wash in PBS, cells were scraped into a small volume of culture medium and collected by centrifugation with 100 μ L of 1X loading buffer for sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 10 mM phosphate buffer pH 7, 10% glycerol, 2.5% SDS, 0.5 mg/mL DTT, 0.16 mg/mL bromophenol blue). The lysates were spun through Nucleospin filters (Macherey-Nagel/Cultek, Madrid, Spain) in order to break denatured chromatin. Ten percent of the sample volume was loaded on SDS-PAGE gels for Western blot analysis.

Western blotting

For the analysis of protein expression in cytoplasmic, mitochondrial and nuclear fractions, 10 μ g of protein from each sample was loaded on SDS-PAGE gels. Western blotting was carried out essentially as described by (Gorina *et al.* 2005). Transferred proteins on polyvinylidene difluoride membranes were incubated overnight at 4°C with one of the following primary antibodies: monoclonal antibody against cytochrome c (clone 7H8.2C12, BD Biosciences/Pharmingen, Madrid, Spain) at a 1 : 1000 dilution; polyclonal antibody against AIF (Serotec/Bionova, Madrid, Spain) at a 1 : 2000 dilution; monoclonal antibody against heat-shock protein 70 (Hsp70, clone W27, Millipore, Madrid, Spain) at a 1 : 2000 dilution; a polyclonal antibody against VDAC (ab15895, Abcam Ltd, Cambridge, UK) used at a 1 : 1000 dilution; a polyclonal antibody against α -actin (Sigma, Madrid, Spain), used at 1 : 5000; a monoclonal antibody against TATA-binding protein (ab818, Abcam Ltd, Cambridge UK), used at 1 : 2000; a monoclonal antibody against Lamin A/C (clone JOL2, Millipore, Madrid, Spain), used at 1 : 200, and a monoclonal antibody against α II-spectrin that recognizes an epitope in the C-terminal region of the protein (MAB1622, Millipore, Madrid, Spain) (Axelsson *et al.* 2006), used at 1 : 1000. The blots were further incubated for 1 h with the following dilutions of the horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG Immunoglobulins of the appropriate specificity: 1 : 1000 (Lamin A/C), 1 : 2000 (cytochrome c, AIF, Hsp70, TATA-binding protein) or 1 : 10000 (VDAC, α -actin). Images were obtained by exposure of the membranes to X-ray film after a luminol-based chemiluminescence reaction. Once data were obtained, blots were re-probed with other antibodies as indicated in the figure legends, in order to obtain a control for equal loading. Hsp70 was used as a loading control for the cytoplasmic and mitochondrial fractions used in Fig. 2(a), since there was no change in its basal levels of expression in SH cells after treatment, and it was found in both fractions. Band intensity was analysed by densitometry with Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Barcelona, Spain), and data were normalised by the relative intensity of the bands corresponding to the loading control, where indicated.

ATP quantitation

Intracellular ATP levels were determined by using a chemiluminescence-based kit (SIGMA). Extracts were prepared from RA-differentiated SH cells seeded on six cm Petri dishes at 3×10^5 cells per dish and treated as indicated. Cells were maintained at 4°C throughout the extraction. Cells were scraped

into a small volume of medium, collected by centrifugation, and washed once in PBS. The cell pellet was suspended in 1X lysis buffer (Somatic Cell ATP Releasing agent, SIGMA, Madrid, Spain) and spun for 1 min at full speed in a microfuge. The supernatant was saved and stored at -20°C until assayed. ATP quantitation in the extracts was performed according to the manufacturer's instructions. Samples were assayed in duplicate and an ATP standard was run in parallel. Chemiluminescence was measured in an Orion microplate luminometer (Berthold/Labnet, Madrid, Spain). Results were normalised according to the protein content of the extracts.

Flow cytometry measurement of apoptosis

All-*trans*-retinoic acid-differentiated SH cells seeded on six cm Petri dishes were scraped into a small volume of culture medium at the end of the indicated treatments. The cells were pooled by centrifugation, washed in cold PBS and spun again. The cell pellet was suspended in PBS with a Pasteur pipette to avoid excessive clumping of the cells. A triple volume of 70% ethanol was added to fix the cells, which were kept at -20°C until assayed. For the analysis of apoptosis by flow cytometry, cells were spun, washed in PBS and permeabilised by resuspension in a PI-staining solution (0.2 mg/mL RNase A, 0.1% Triton X100 in PBS, 20 μ g/mL PI) at 4°C in the dark, which allowed the quantitation of the relative amount of DNA per nucleus in all cells by flow cytometry. Data were obtained in an Epics XL flow cytometer (Beckman-Coulter Corporation/IZASA, Barcelona, Spain). The percentage of apoptosis was estimated from the area corresponding to the sub-G1 population (Riccardi and Nicoletti 2006).

Caspase-3 activity measurement

Caspase-3 activity was determined essentially as described elsewhere (Valencia and Moran 2004) but with minor modifications. Briefly, cells were scraped off from six-cm Petri dishes for SH, or from 24-well plates for neurons (see above), washed once in PBS and lysed in 50 μ L of a buffer containing 0.2% CHAPS, 100 mM/1 mM HEPES-EDTA pH 7.5, 10% sucrose, 20 μ M EGTA, 10 mM DTT, 2 μ g/mL Aprotinin, 2 μ g/mL Pepstatin, 10 μ g/mL Leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM NaF and 0.03% digitonin. Samples were stored at -80°C until assayed. Prior to the assay, samples were thawed and sonicated, and an aliquot was used to determine the protein content. Caspase activity was determined by a fluorogenic technique on a fluorescence microplate reader (SpectraMax GeminiXS, Molecular Devices/Bionova, Madrid, Spain), using Ac-DEVD-AMC as caspase-3 substrate (final concentration 25 μ M) and sample volumes containing 50 μ g of protein. Fluorescence measurements were obtained with wavelength settings of 360 nm (excitation) and 460 nm (emission), every minute for 30 min following the addition of the substrate. Caspase activity was expressed as Δ fluorescence/min/mg protein. To normalise for interexperimental variability, values are expressed as percentage of control for each experiment ($n = 2-3$ samples per condition). Three different experiments were performed and the mean value was obtained.

Detection of caspase-3 positive cells

SH cells (3×10^5) were seeded on round coverslips placed in six cm Petri dishes and differentiated with RA as described above. Cells

were fixed at the end of the indicated treatments in 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature (RT), washed with PBS and kept at 4°C until used. Prior to immunostaining, cells were permeabilised in 0.2% Triton X-100 in PBS for 8 min at RT, washed with PBS, incubated for 1 h at RT in blocking solution (3% goat serum in PBS), and washed again with PBS. Active caspase-3 was detected by incubating overnight at 4°C with a specific antibody (cat. # 9661, Cell Signalling/IZASA, Barcelona, Spain) at 1 : 200 dilution in PBS containing 1% goat serum. After washing once with PBS, immune complexes were detected by incubating for 1 h at RT with an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen, Barcelona, Spain) in PBS containing 1% goat serum. Positive cells were counted in micrographs taken from four randomly chosen fields per condition. The total number of cells in the same fields was obtained by counter-staining nuclei with Hoechst 33342, and used to calculate the percentage of cells with active caspase-3.

Statistical analysis

Data were analysed by GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA) by either two-way ANOVA followed by *post-hoc* analysis with Bonferroni's test, Student's *t*-test, or one-sample *t*-test, as indicated in the figure legends.

Results

We subjected 5-day RA-differentiated SH cells to OGD for time periods ranging from 15 to 24 h, and calculated the percentage of cell death at the end of such incubation periods by PI-staining of cells with compromised membrane integrity (see Methods). 15 h-OGD resulted in the death of about 5% of cells (Fig. 1b and c, arrowhead). Mortality increased along with the time of incubation under OGD conditions, reaching about 70% at 24 h (data not shown). The presence of glucose in 24 h-incubation under anoxic conditions prevented cell death as only around 12% of the cells died (data not shown). We analysed whether glucose would regulate delayed cell death during reoxygenation following a transient episode of OGD. We performed time-course experiments (see Fig. 1a for a description of the experiments), where initial 15 h-incubation under OGD conditions was followed by different periods of reoxygenation in the presence or absence of 11 mM glucose. Figure 1(b) shows a representative experiment where sets of micrographs were obtained at the end of the incubation in anoxia (in either the presence (A+) or absence (A-) of 11 mM glucose), and at the end of a 6 h-period of reoxygenation in the absence or presence of 11 mM glucose (A-/R- and A-/R+, respectively) following incubation in OGD. Anoxia alone did not affect cell morphology (compare the top panel in Fig. 1(b) and the right panel in supplementary Fig. S1), whereas suppression of oxygen and glucose for 15 h caused a marked change, characterised by the retraction of neurites, the rounding-up of cells (Fig. 1b and supplementary movie) and the fission of mitochondria (supplementary Fig. S2), the latter being a feature that has been shown to

precede apoptosis (Youle and Karbowski 2005). The A+/R+ group showed little death at any time point (Fig. 1c). In contrast, in both the glucose - (A-/R-) and glucose + (A-/R+) groups, the proportion of dead cells increased significantly along with the time of reoxygenation (Fig. 1c). Nevertheless, glucose supplementation up on reoxygenation induced a significantly higher level of cell death, which in the A-/R+ group reached about 22% at 6 h of reoxygenation, with subsequent smaller increases at 9 h and 24 h. Therefore, under these experimental conditions, glucose accelerated the process of cell death during reoxygenation.

We looked into mechanisms that could explain the delayed death effect observed after OGD plus reoxygenation. Since both caspase-dependent and independent pathways of apoptosis have been described in animal models of ischemia-reperfusion (see Introduction) we sought to investigate these forms of cell death in our model of OGD-reoxygenation. The release of cytochrome c from mitochondria triggers the sequential activation of caspases that leads to cell death by apoptosis (Kumar 2007). We examined the relative abundance of cytochrome c in mitochondria and cytoplasm at different times of exposure of SH cells to OGD conditions and found that by 15 h a large proportion of the mitochondrial cytochrome c was released into cytoplasm (data not shown and Fig. 2a). Because of the effects of glucose accelerating the death rate of cells after OGD, we examined whether the presence of glucose during reoxygenation would affect the relative amount of cytochrome c present in cytoplasm at 6 h of reoxygenation. We found a significantly higher abundance of cytochrome c in cytoplasm in the glucose + (A-/R+) group (Fig. 2a). Apoptosis-inducing factor (AIF) has been described as inducing caspase-independent apoptosis after migrating from the cytoplasm into the nucleus (Cande *et al.* 2002). We also detected release of AIF from mitochondria to cytoplasm with the same timing as cytochrome c, but to a somewhat lesser extent (Fig. 2a). There were no significant differences between the glucose - (A-/R-) and glucose + (A-/R+) groups (Fig. 2a). In time-course experiments we detected AIF in the nuclear fraction of SH cells subjected to different periods of OGD and reoxygenation in the presence or absence of glucose (Fig. 2b). However, we found that AIF was also present in the nuclei of SH cells under control conditions, and there was no further increase of nuclear AIF after OGD or reoxygenation, indicating that AIF that was released from mitochondria after OGD did not translocate into the nucleus (Fig. 2b, left panel). This suggests that AIF might not have a role in inducing apoptosis under these conditions. Our nuclear fractionation method was validated by western blotting of cellular fractions prepared from cells under control conditions, and probed with antibodies against Lamin A/C and VDAC. The relative abundance of AIF in the same fractions was also analysed (Fig. 2b). This showed that AIF was most

abundant in mitochondria with a smaller expression in the nuclear fraction, which was devoid of mitochondrial contamination.

The release of cytochrome *c* after OGD suggested that caspase-dependent apoptosis might take place during the reoxygenation phase. Thus, we used flow cytometry of fixed and permeabilised PI-stained cells to calculate the percentage of apoptosis by measuring the area of the sub-G1 population (see Methods) after OGD and at different reoxygenation periods in the absence or presence of glucose (Fig. 3a). The presence of glucose caused an increase in the percentage of apoptosis at 3, 6 and 9 h after reoxygenation, and the difference between the glucose – (A–/R–) and glucose + (A–/R+) groups was significant at 6 h (Fig. 3a). On the other hand, this difference almost disappeared 24 h after reoxygenation. These results prompted us to seek further evidence of caspase-mediated cell death 6 h after reoxygenation. Thus, incubation of cells for 6 h in the presence of glucose (A–/R+ group) caused a significant increase in caspase-3 activity relative to the group lacking glucose (A–/R–, Fig. 3b), as detected in cellular extracts. Furthermore, immunodetection (see Methods) showed that the percentage of cells with active caspase-3 6 h after reoxygenation in the presence of glucose was also significantly higher than in the absence of glucose [$3.91\% \pm 0.40$ (A–/R+) vs. $0.34\% \pm 0.10$ (A–/R–), $n = 3$, $p < 0.001$]. All in all, it suggested that glucose might somehow trigger the caspase-activation cascade leading to apoptosis. Previous reports have shown that caspase-3 and calpain are characteristically activated in SH cells during the course of apoptosis induced by a variety of stimuli (Nath *et al.* 1996; Sanvicens *et al.* 2006). The cytoskeletal protein α II-spectrin is potentially cleaved by these two proteases and gives characteristic fragments that can be detected by Western blotting with an antibody raised against a peptide comprised in the C-terminal region of the protein. Thus, calpain cleavage produces a doublet at 150 and 145 kDa, whereas caspase-3 contributes a 150-kDa band and generates a specific 120-kDa band (Wang 2000). A 150 kDa-cleavage product was already present in cells under control conditions, but OGD plus 6 h of reoxygenation in the absence of glucose brought about the intensification of the 150-kDa product and the appearance of the 145 kDa band, resulting in the formation of a doublet (Fig. 3c, upper panel). The intensity of these bands was further enhanced by the presence of glucose during reoxygenation (Fig. 3c, upper panel). Treatment of cells with the calpain inhibitor calpeptin during 6 h of reoxygenation in either condition inhibited the formation of the 145-kDa band and diminished the intensity of the 150-kDa one. A longer exposure of the gel (Fig. 3c, bottom panel) showed a 120 kDa-band that is expected to originate from the cleavage of α II-spectrin by caspase-3. This band became more intense in the glucose-treated group, and was strongly reduced by treatment of the cells with calpeptin (Fig. 3c and d). The caspase inhibitor zVAD-fmk also

prevented the increase in the intensity of the 120-kDa band in the glucose-treated group (Fig. 3d). Treatment with both protease inhibitors had an additive effect in reducing the intensity of the 150-kDa doublet.

On the basis of these results, we analyzed the effect of both protease inhibitors on the induction of cell death by glucose when added at the onset of a 6 h-period of reoxygenation, a time which showed the maximal differences in the proportion of cell death between the glucose – (A–/R–) and glucose + (A–/R+) groups, as detected by live-staining with PI (Fig. 1c) or sub-G1 peak estimation of apoptosis (Fig. 3a). Calpeptin was only able to inhibit cell death that was detected by live staining with PI, and to a lower extent than zVAD-fmk. Nevertheless, zVAD-fmk significantly prevented the induction of cell demise due to the presence of glucose as detected by either method (Fig. 3e and f). None of the inhibitors caused a statistically significant effect on the level of cell death in the glucose-free group (Fig. 3e and f). In keeping with this, the percentage of apoptosis developed during 6 h reoxygenation under glucose-free conditions did not seem to have progressed far from the values already observed at the end of the anoxia phase (A–/R–, Fig. 3a) and could help explain the lack of effect of the protease inhibitors on this group. The analysis of the difference between the glucose – (A–/R–) and glucose + (A–/R+) groups when treated with zVAD-fmk (black bars, Fig. 3f) did not reveal any statistical significance.

It has been reported that cell death by apoptosis requires energy in the form of ATP (Nicotera *et al.* 1998). We quantitated ATP in cell extracts prepared from cells incubated under the conditions indicated and found that OGD greatly decreased the cellular levels of ATP (A–, Fig. 4), reaching levels of only about 5% of basal. Such a dramatic decrease in ATP content was somewhat prevented by inclusion of glucose in the media during anoxia (A+, Fig. 4). Nevertheless, reoxygenation of cells that had been subjected to OGD brought about a rapid recovery in ATP levels, which attained significantly higher levels at 6 h of reoxygenation in cells that were kept in media supplemented with glucose (compare A–/R– and A–/R+, Fig. 4). The difference between the A–/R– and A–/R+ groups disappeared after 24 h of reoxygenation, when ATP levels almost reached control levels in both groups.

We sought for evidence that indicated whether the effect of glucose increasing cell death after reoxygenation might also occur in primary cultures of neurons as well. Caspase-3 activity assays were carried out on extracts prepared from cortical neurons subjected to 1 h OGD followed by 6 h reoxygenation either in the absence (A–/R– group) or presence of glucose (A–/R+ group, Fig. 5a). Similarly to the SH cells, the presence of glucose induced a significant increase in caspase-3 activity (Fig. 5b), thus suggesting that glucose at the reoxygenation period after OGD promoted caspase-3 dependent apoptosis in neurons as well as in SH cells.

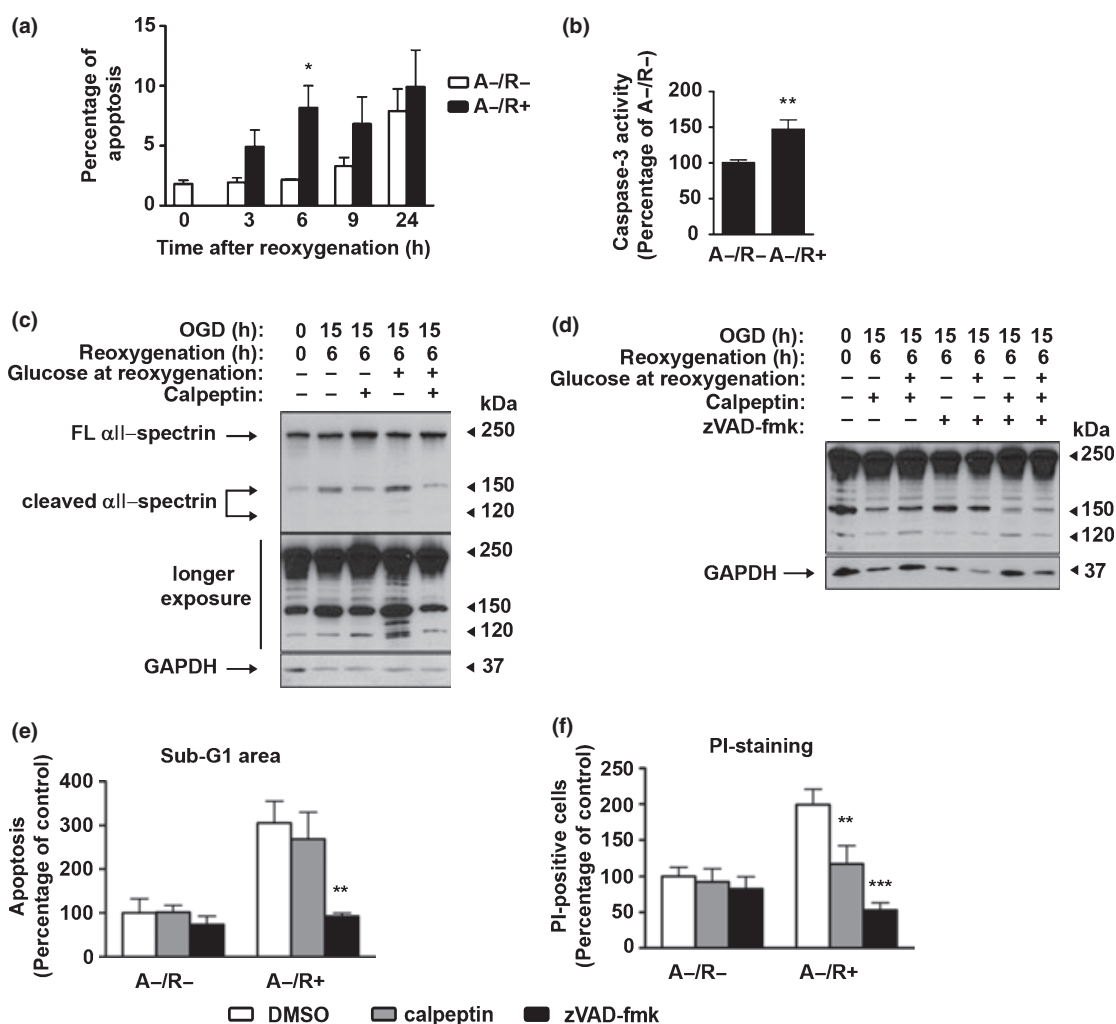


Fig. 3 The general caspase inhibitor zVAD-fmk abolishes glucose-induced delayed cell death. (a) SH cells were subjected to OGD followed by reoxygenation in the absence or presence of glucose for different periods, as described in Fig. 1c. At the times indicated, cells were harvested, fixed and stained with PI (see Methods). They were analysed by flow cytometry and the area of the sub-G1 peak was quantitated to provide an estimate of the percentage of apoptosis. Data shown are the average \pm SEM of at least three experiments, and were analysed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test. * $p < 0.05$. (b) Caspase-3 activity was determined in cytoplasmic extracts prepared from SH cells subjected to 15 h-OGD followed by 6 h reoxygenation in the absence or presence of 11 mM glucose (see Methods). Data are expressed as percentage of the activity of the A-/R- group and shown as the average \pm SEM of nine experiments. Data were analysed by Student's *t*-test. ** $p < 0.01$. (c) α II-spectrin cleavage products were detected in total cellular extracts prepared from SH cells subjected to 15 h-OGD plus reoxygenation for 6 h in the absence or presence of 11 mM glucose. The calpain inhibitor calpeptin was added at 30 μ M final concentration on reoxygenation starting, where indicated. Extracts were also obtained from cells prior to starting the OGD as a control. Arrows indicate full length (FL) and the 150-145 kDa cleaved α II-spectrin fragments due to calpain activity. The membrane was re-blotted with anti-GAPDH antibody to

provide for a loading control. (d) α II-spectrin cleavage pattern in total cell extracts prepared from cells treated in identical conditions as in (c), with 30 μ M calpeptin, 50 μ M zVAD-fmk or a combination of the two inhibitors. Volumes of DMSO were adjusted for all groups. The membrane was re-blotted with anti-GAPDH antibody to provide for a loading control. (e) SH cells were subjected to 15 h-OGD followed by 6 h of reoxygenation in the presence or absence of 11 mM glucose. Thirty micromolar calpeptin or 50 μ M zVAD-fmk were added upon reoxygenation, as indicated. The percentage of apoptosis in each condition was calculated as indicated in (a). Data were expressed as percentage of the average value of the A-/R- group treated with DMSO only (control), and are represented as the average \pm SEM of three experiments. Data were analysed by two-way ANOVA (by treatment and condition) followed by Bonferroni's test. ** $p < 0.01$. (f) SH cells were treated as in (e), and the percentage of death was estimated by counting the number of PI-positive cells, as indicated in Fig. 1c. Data were expressed as percentage of the average value of the A-/R- group treated with DMSO only (control), and are shown as the average \pm SEM of at least six experiments. The proportion of apoptotic cells in the control group was approximately 2.5%. Data were analysed by two-way ANOVA (by treatment and condition) followed by Bonferroni's test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. The same colour key to the treatments applies for both (e) and (f).

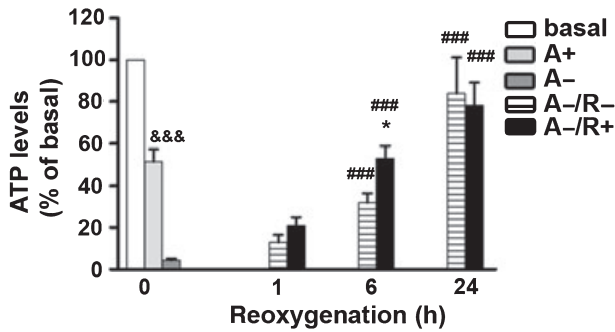


Fig. 4 OGD induces a drop in ATP levels, which recover faster if glucose is provided at reoxygenation. ATP levels were determined in cell extracts prepared from RA-differentiated SH cells subjected to 15 h-OGD followed by different periods of reoxygenation in the presence or absence of 11 mM glucose, as indicated. ATP levels in untreated cells (basal), and cells subjected to 15 h-anoxia in the presence of 11 mM glucose (A+) are included as controls. Data were expressed as a percentage of basal and represent the average \pm SEM of at least four experiments. Data were analysed by two-way ANOVA (by condition and time) followed by Bonferroni's test. *A-/R+ vs. A-/R-, 6 h, $p < 0.05$; ###A-/R- or A-/R+ at 6 and 24 h vs. A-, $p < 0.001$; &&&A+ vs. A-, $p < 0.001$.

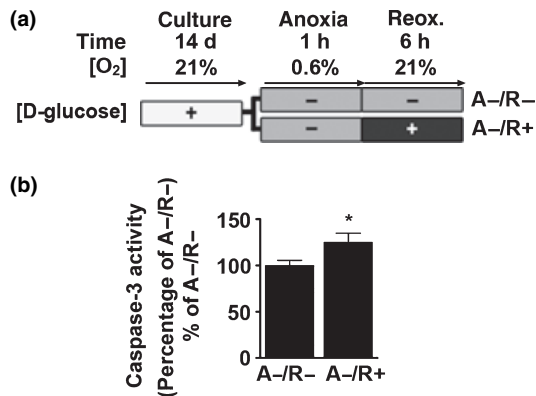


Fig. 5 Six hour reoxygenation in the presence of glucose increases caspase-3 activity in primary cultures of neurons. (a) Diagram of the experimental set-up of the OGD and reoxygenation experiments in primary cultures of rat neurons. (b) Caspase-3 activity was determined in cytoplasmic extracts prepared from primary cultures of rat neurons subjected to 1 h-OGD followed by 6 h reoxygenation in the absence or presence of 25 mM glucose (see Methods). Data were expressed as percentage of the activity of the A-/R- group and are represented as the average \pm SEM of three experiments. Data were analysed by Student's *t*-test. * $p < 0.05$.

Discussion

Our data show that glucose provided upon reoxygenation causes a higher death rate in cells previously subjected to 15 h OGD. The effects of glucose seem to involve increased caspase and calpain activities, as deduced from the effects of their corresponding inhibitors. The continued absence of glucose at reoxygenation after OGD does not preclude death,

but seems to reduce it to a certain extent. Since ATP (Nicotera *et al.* 1998) and cytochrome *c* are among the factors required for the formation of the apoptosome, the greater abundance of cytochrome *c* in the cytosol and a faster recovery of cellular ATP levels in the glucose-treated group suggest that the combination of these two circumstances might be involved in accelerating death. In keeping with this, earlier reports examined the relationship between cellular ATP levels and apoptotic death. By using an intracellular luciferase-based reporter, Zamaraeva and colleagues showed that apoptotic stimuli such as staurosporine induced an increase in the intracellular levels of ATP that coincided with the activation of caspases and the execution of apoptosis in HeLa cells (Zamaraeva *et al.* 2005). Moreover, they found that ATP produced by glycolysis was the main contributor to this surge, with a relatively smaller role for mitochondria-derived ATP. Glycolytic ATP was also necessary for caspase-3 activation and increased Annexin V binding observed on treatment with staurosporine (Zamaraeva *et al.* 2005). Other reports have explored the role of initial ATP levels in committing the cell to either necrosis or apoptosis upon the challenge with an apoptotic inducer and found that depletion of ATP levels tilted the balance towards necrosis, while the recovery of ATP favoured death by apoptosis (Eguchi *et al.* 1997; Leist *et al.* 1997). In our model, both the A-/R- and A-/R+ groups entered the reoxygenation phase with low levels of ATP caused by the 15 h incubation under OGD conditions. Nevertheless, ATP levels started recovering soon after bringing cells back to normoxia, although at an apparently higher rate in the presence of glucose. This leads us to speculate that the increased availability of ATP might have to do with the faster development of apoptosis in the A-/R+ group and that the concomitant slow recovery of ATP levels may result in a shift from apoptosis to necrosis.

Even though we observed a substantial release of cytochrome *c* from mitochondria by OGD (Fig. 2), not all cells died in the following hours, and cellular ATP levels slowly recovered to almost normal at 24 h of reoxygenation (Fig. 4). The latter occurred in both the presence and absence of glucose at reoxygenation, suggesting that mitochondrial production of ATP remains functional under these conditions. This phenomenon has been previously observed, and it seems that cytochrome *c* in a diffuse cytoplasmic location can still help maintain the mitochondrial membrane potential necessary for the production of ATP (Waterhouse *et al.* 2001). Presumably, cells kept in the absence of glucose at reoxygenation would resort to the oxidation of fatty acids or amino acids present in the medium for producing ATP (the RPMI medium used in the experiments of OGD plus reoxygenation does not contain pyruvate). SH cells provided with glucose at reoxygenation had significantly higher ATP levels at 6 h of reoxygenation, which is an indication that glycolytic metabolism may contribute importantly (but not exclusively) to the production of ATP under these conditions.

The SH cells used in our model display a high resistance to long incubations under OGD conditions, which is not paralleled by neuronal primary cultures (Culmsee *et al.* 2005). Our OGD model causes a modest death rate, which occurs in spite of a substantial release of cytochrome *c* from mitochondria into cytosol. Although we do not have a complete explanation for this paradoxical result, regulatory steps impairing the activation of caspases that would normally follow the release of cytochrome *c* may operate in our model and should be taken into account when considering the implications of our results for neuronal death. Notably, Hsp70 has been shown to sequester apoptosis protease-activating factor-1 and prevent its interaction with procaspase-9 in the formation of the apoptosome (Beere *et al.* 2000), although this is a controversial matter (Steel *et al.* 2004). Nonetheless, Hsp70 is constitutively expressed in tumour cells, where it is related to their resistance to apoptosis (Garrido *et al.* 2006). SH cells display high levels of expression of Hsp70 under control conditions and these are kept after OGD followed by reoxygenation (Fig. 2a) (Pan *et al.* 2005). The constitutive expression of Hsp70 in SH cells may also help explain our results showing that AIF released from mitochondria after OGD fails to translocate to the nucleus (Fig. 2b). Thus, Gurbuxani *et al.* showed that endogenous levels of expression of Hsp70 cause retention of AIF in the cytoplasm by physical interaction, preventing the activation of caspase-independent apoptosis (Gurbuxani *et al.* 2003). Nevertheless, we found that AIF is present in nuclei under control conditions, indicating that there might be inhibitory mechanisms that preclude AIF from inducing apoptosis besides retention by Hsp70. Demonstrating whether Hsp70 is involved in the above mentioned mechanisms will require further investigation.

Our caspase-3 activity data in primary cultures of neurons showing that the presence of glucose during reoxygenation following 1 h OGD induces a higher caspase-3 activity are coincidental with the data obtained in SH cells and suggests that similar mechanisms may operate at this level. Nevertheless, further experiments will be required to fully characterise the effects of glucose in primary neuronal cultures.

All in all, our results show that, after a transient period of ischemia, glucose accelerates cell death in our system by a caspase-dependent mechanism.

Acknowledgements

We are grateful to Anna Sola and Gina Hotter (IIBB-CSIC/IDIBAPS) for providing the anoxia incubation chambers; Jaume Comas (Serveis Científics i Tècnics, Universitat de Barcelona) for his help on flow cytometry experiments; Maria Calvo and Anna Bosch of the Confocal Microscopy Facility of Serveis Científics i Tècnics (Universitat de Barcelona-IDIBAPS) for their assistance with the time-lapse microscopy experiments; Josep Saura (IIBB-CSIC/IDIBAPS) for providing the Lamin A/C antibody; Raúl

Broceño for his assistance on the time-lapse video editing; and Robin Rycroft at the Serveis Lingüístics at the University of Barcelona for revision of English. A.S-P. is recipient of a pre-doctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya, Spain. E.V. holds a Juan de la Cierva post-doctoral contract from Spanish Ministry of Education and Science (MEC). T.S. holds a Ramón y Cajal scientist contract from MEC. This project was funded by a grant from MEC (T.S., SAF2005-05793-C02-02).

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article:

Fig. S1 Morphological change of SH cells differentiated for five days with 10 μ M RA.

Fig. S2 Mitochondrial fission after a 15-h OGD in RA-differentiated SH cells.

Video Clip S1 A 15-h OGD causes major morphological alterations in RA-differentiated SH cells.

This material is available as part of the online article from: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1471-4159.2008.05467.x> (This link will take you to the article abstract).

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- Alison M. R. and Sarraf C. E. (1992) Apoptosis: a gene-directed programme of cell death. *J. R. Coll. Physicians Lond.* **26**, 25–35.
- Axelsson V., Holback S., Sjogren M., Gustafsson H. and Forsby A. (2006) Gliotoxin induces caspase-dependent neurite degeneration and calpain-mediated general cytotoxicity in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1068–1074.
- Beere H. M., Wolf B. B., Cain K., Mosser D. D., Mahboubi A., Kuwana T., Taylor P., Morimoto R. I., Cohen G. M. and Green D. R. (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* **2**, 469–475.
- Cande C., Cohen I., Daugas E., Ravagnan L., Larochette N., Zamzami N. and Kroemer G. (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* **84**, 215–222.
- Cao G., Clark R. S., Pei W., Yin W., Zhang F., Sun F. Y., Graham S. H. and Chen J. (2003) Translocation of apoptosis-inducing factor in vulnerable neurons after transient cerebral ischemia and in neuronal cultures after oxygen-glucose deprivation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 1137–1150.
- Culmsee C., Zhu C., Landshamer S., Becattini B., Wagner E., Pellecchia M., Blomgren K. and Plesnila N. (2005) Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **25**, 10262–10272.
- Dirnagl U., Iadecola C. and Moskowitz M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* **22**, 391–397.
- Eguchi Y., Shimizu S. and Tsujimoto Y. (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* **57**, 1835–1840.

- Endres M., Namura S., Shimizu-Sasamata M., Waerber C., Zhang L., Gomez-Isla T., Hyman B. T. and Moskowitz M. A. (1998) Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 238–247.
- Ferrer I. and Planas A. M. (2003) Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 329–339.
- Ferrer I., Friguls B., Dalfo E., Justicia C. and Planas A. M. (2003) Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **29**, 472–481.
- Fink K., Zhu J., Namura S., Shimizu-Sasamata M., Endres M., Ma J., Dalkara T., Yuan J. and Moskowitz M. A. (1998) Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 1071–1076.
- Fujita R. and Ueda H. (2003) Protein kinase C-mediated necrosis-apoptosis switch of cortical neurons by conditioned medium factors secreted under the serum-free stress. *Cell Death Differ.* **10**, 782–790.
- Garrido C., Brunet M., Didelot C., Zermati Y., Schmitt E. and Kroemer G. (2006) Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* **5**, 2592–2601.
- Gorina R., Petegnief V., Chamorro A. and Planas A. M. (2005) AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway. *J. Neurochem.* **92**, 505–518.
- Gurbuxani S., Schmitt E., Cande C. *et al.* (2003) Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* **22**, 6669–6678.
- Hata R., Maeda K., Hermann D., Mies G. and Hossmann K. A. (2000) Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **20**, 306–315.
- Hossmann K. A. (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.* **36**, 557–565.
- Kametsu Y., Osuga S. and Hakim A. M. (2003) Apoptosis occurs in the penumbra zone during short-duration focal ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 416–422.
- Kidwell C. S., Alger J. R. and Saver J. L. (2004) Evolving paradigms in neuroimaging of the ischemic penumbra. *Stroke* **35**, 2662–2665.
- Kirino T. (2000) Delayed neuronal death. *Neuropathology* **20** Suppl., S95–S97.
- Kumar S. (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* **14**, 32–43.
- Leist M., Single B., Castoldi A. F., Kühnle S. and Nicotera P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* **185**, 1481–1486.
- Li Y., Chopp M., Jiang N., Zhang Z. G. and Zaloga C. (1995) Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **26**, 1252–1257.
- Liang Y., Yan C., Nylander K. D. and Schor N. F. (2003) Early events in Bcl-2-enhanced apoptosis. *Apoptosis* **8**, 609–616.
- Nath R., Raser K. J., Stafford D., Hajimohammadreza I., Posner A., Allen H., Talanian R. V., Yuen P., Gilbertsen R. B. and Wang K. K. (1996) Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem. J.* **319**, 683–690.
- Nicotera P., Leist M. and Ferrando-May E. (1998) Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol. Lett.* **102–103**, 139–142.
- Pahlman S., Ruusala A. I., Abrahamsson L., Mattsson M. E. and Esscher T. (1984) Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation. *Cell Differ.* **14**, 135–144.
- Pan T., Li X., Xie W., Jankovic J. and Le W. (2005) Valproic acid-mediated Hsp70 induction and anti-apoptotic neuroprotection in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett.* **579**, 6716–6720.
- Petegnief V., Saura J., Gregorio-Rocasolano N. and Paul S. M. (2001) Neuronal injury-induced expression and release of apolipoprotein E in mixed neuron/glia co-cultures: nuclear factor [kappa]B inhibitors reduce basal and lesion-induced secretion of apolipoprotein E. *Neuroscience* **104**, 223–234.
- Plesnila N., Zhu C., Culmsee C., Groger M., Moskowitz M. A. and Blomgren K. (2004) Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **24**, 458–466.
- Riccardi C. and Nicoletti I. (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protocols* **1**, 1458–1461.
- Rojas S., Martin A., Justicia C., Falcon C., Bargallo N., Chamorro A. and Planas A. M. (2006) Modest MRI signal intensity changes precede delayed cortical necrosis after transient focal ischemia in the rat. *Stroke* **37**, 1525–1532.
- Sairanen T., Karjalainen-Lindsberg M. L., Paetau A., Ijas P. and Lindsberg P. J. (2006) Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke—a possible target of antiapoptotic treatments. *Brain* **129**, 189–199.
- Sanvicens N., Gomez-Vicente V., Messeguer A. and Cotter T. G. (2006) The radical scavenger CR-6 protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress-induced apoptosis: effect on survival pathways. *J. Neurochem.* **98**, 735–747.
- Snider B. J., Gottron F. J. and Choi D. W. (1999) Apoptosis and necrosis in cerebrovascular disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **893**, 243–253.
- Steel R., Doherty J. P., Buzzard K., Clemons N., Hawkins C. J. and Anderson R. L. (2004) Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 51490–51499.
- Ueda H. and Fujita R. (2004) Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 950–955.
- Valencia A. and Moran J. (2004) Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 1112–1125.
- Wang K. K. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* **23**, 20–26.
- Waterhouse N. J., Goldstein J. C., von Ahsen O., Schuler M., Newmeyer D. D. and Green D. R. (2001) Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J. Cell Biol.* **153**, 319–328.
- Yin X. M., Luo Y., Cao G., Bai L., Pei W., Kuharsky D. K. and Chen J. (2002) Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *J. Biol. Chem.* **277**, 42074–42081.
- Youle R. J. and Karbowski M. (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 657–663.
- Zamaraeva M. V., Sabirov R. Z., Maeno E., Ando-Akatsuka Y., Bessonova S. V. and Okada Y. (2005) Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ.* **12**, 1390–1397.
- Zhao B. Q., Wang S., Kim H. Y., Storrie H., Rosen B. R., Mooney D. J., Wang X. and Lo E. H. (2006) Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat. Med.* **12**, 441–445.

Figure S1

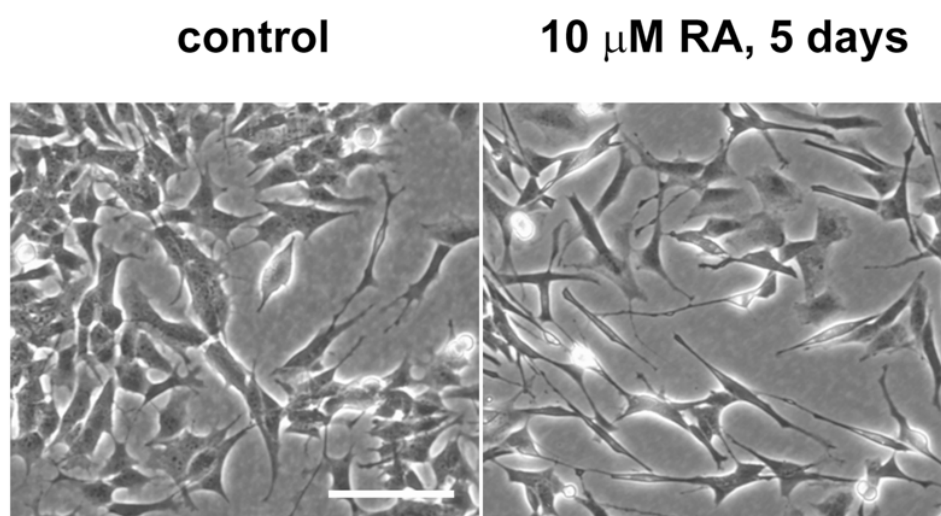
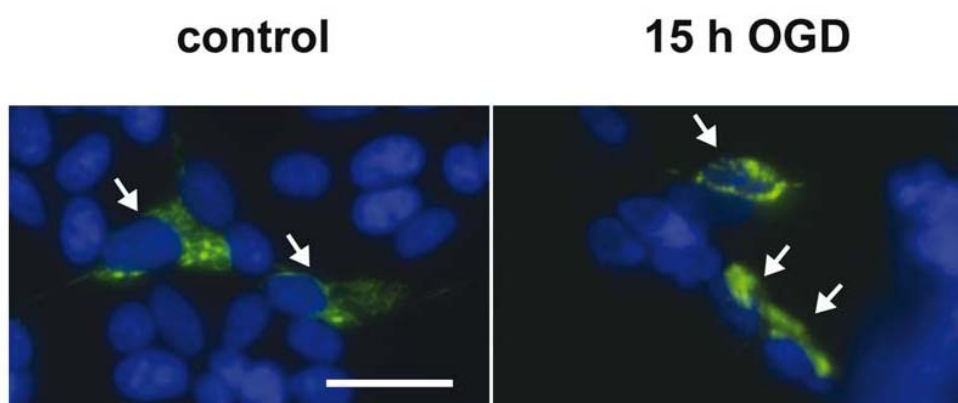


Figure S2



Supplementary figure S1. Morphological change of SH cells differentiated for five days with 10 μ M RA. SH cells seeded on 6 cm Petri dishes were kept in the presence or absence of 10 μ M RA in growth medium (see Methods) for five days. Phase contrast micrographs were obtained on an Olympus (Barcelona, Spain) inverted microscope. RA induced the formation of cell processes that were longer than those displayed by cells under control conditions. Some of these processes formed varicosities. Bar=100 μ m.

Supplementary figure S2. Mitochondrial fission after a fifteen-hour OGD in RA-differentiated SH cells. SH cells seeded in 6-well plates were transfected with Superfect reagent (Qiagen/Izasa, Madrid, Spain) with vector pEYFP-Mito (Clontech/Nucliber, Madrid, Spain) on the third day of differentiation with 10 μ M RA. This vector encodes EYFP fused to a mitochondrial-targeting sequence of human cytochrome c oxidase subunit VIII. Differentiation was allowed to proceed until a total of five days, when cells were subjected to 15h-OGD or were kept in differentiation medium for an equivalent period under normoxia. At the end of this period, EYFP-labelled mitochondria in transfected cells (white arrows) were visualised in an Olympus (Barcelona, Spain) epifluorescence inverted microscope. Nuclei in all cells were live-stained with Hoechst 33342. Bar=50 μ m.

Supplementary movie. A fifteen-hour OGD causes major morphological alterations in RA-differentiated SH cells. SH cells seeded on 22 mm \varnothing glass coverslips and differentiated for five days in 10 μ M RA were mounted in an incubation chamber set at 37°C on an inverted confocal microscope (Leica,

Barcelona, Spain) to perform time-lapse microscopy during a 15h-OGD. These conditions were achieved by keeping the cells in the presence of glucose-free RPMI-based medium, and continuously flushing the chamber with a mixture of 95% N₂ and 5% CO₂. Phase-contrast micrographs were taken at five-minute intervals. Images were assembled using the Image Processing Leica Confocal Software. MPEG video format rendering was achieved with Codec FFmpeg MPEG1/2 (Mainconcept, Aachen, Germany).

2. Article 2

Extended ischemia prevents HIF1 α degradation at reoxygenation by impairing prolyl-hydroxylation: Role of Krebs cycle metabolites

Anna Serra-Pérez, Anna M. Planas Analía Núñez-O'Mara, Edurne Berra, Judit García-Villoria, Antonia Ribes, and Tomàs Santalucía. J Biol Chem 2010 Apr 5 (Publicació electrònica pendent d'impressió)

Aquest treball s'ha centrat en l'estudi de la resposta a la hipòxia: s'ha avaluat l'activació del factor de transcripció induïble per hipòxia HIF1 en el model d'isquèmia *in vitro* de cèl·lules SH-SY5Y diferenciades. La privació exclusiva d'oxigen (OD) induïx significativament una major expressió de la subunitat induïble del factor (HIF1 α) i conseqüentment major activitat de HIF1, traduïda en major expressió de gens diana (enzims del metabolisme de la glucosa i VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor). Quan la privació és d'oxigen i glucosa (OGD) la inducció de HIF1 α i l'activació del factor són menors.

En la reoxigenació posterior a l'OD HIF1 α és ràpidament degradat pel sistema clàssic dependent d'oxigen que implica l'acció consecutiva dels enzims Prolilhidroxilases (PHDs), de la proteïna Von Hippel Lindau (VHLp) que forma part d'un complex ubiquitina-lligasa i el proteasoma. En la reoxigenació posterior a l'OGD això no succeeix i HIF1 α es manté en presència d'oxigen. Aquest és un fenomen dependent de la severitat i durada de l'anòxia.

En aquestes condicions el sistema del proteasoma és funcional, però detectem poca hidroxilació de HIF1 α mediada per PHDs. No existeixen diferències en la concentració d'oxigen assolida entre les dues condicions, però sí en la concentració de metabòlits del cicle de krebs. En condicions d'OGD i posterior reoxigenació disminueixen els nivells d'alfacetoglutarat (co-substrat de la reacció d'hidroxilació) i incrementen els de fumarat (inhibidor). L'addició de fumarat induïx l'expressió de HIF1 α en normòxia en SH-SY5Y diferenciades. Aquest fet ens fa pensar que després de la OGD l'abundància relativa dels metabòlits és menys favorable per a la hidroxilació de HIF1 α i aquest es manté en la reoxigenació tot i la presència d'oxigen.

EXTENDED ISCHEMIA PREVENTS HIF1 α DEGRADATION AT REOXYGENATION BY IMPAIRING PROLYL-HYDROXYLATION: Role of Krebs cycle metabolites*

Anna Serra-Pérez¹, Anna M Planas¹, Analía Núñez-O'Mara², Edurne Berra², Judit García-Villoria³, Antònia Ribes³, and Tomàs Santalucía¹

From ¹Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institute of Biomedical Research of Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ²Cell Biology and Stem Cells Unit, Cooperative Research Centre on Biosciences, Technology Park of Bizkaia, Derio, Spain; ³Department of Biochemistry and Molecular Genetics, and CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

Running title: Persistence of HIF1 α at reoxygenation after ischemia.

Address correspondence to: Tomas Santalucia PhD. Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC/IDIBAPS). Rosselló 161, 6th floor. E-08036 Barcelona, Spain. Phone: +34-933638300 ext. 359. Fax: +34-933638301. E-mail: tomas.santalucia@iibb.csic.es

Hypoxia Inducible Factor (HIF) is a heterodimeric transcription factor that activates the cellular response to hypoxia. The HIF1 α subunit is constantly synthesized and degraded under normoxia, but degradation is rapidly inhibited when oxygen levels drop. Oxygen-dependent hydroxylation by Prolyl-4-hydroxylases (PHD) mediates HIF1 α proteasome degradation. Brain ischemia limits the availability not only of oxygen but also of glucose. We hypothesised that the concurrent absence of glucose and oxygen could have a modulating effect on HIF. We studied HIF1 α in differentiated neuroblastoma cells subjected to ischemia and assessed the separate involvement of oxygen and glucose in HIF1 α regulation. We report higher transcriptional activity and HIF1 α expression under oxygen deprivation in the presence of glucose (OD), than in its absence (oxygen and glucose deprivation, OGD). Unexpectedly, HIF1 α was not degraded at reoxygenation after an episode of OGD. This was not due to impairment of proteasome function, but was associated with lower HIF1 α hydroxylation. Krebs cycle metabolites fumarate and succinate are known inhibitors of PHD, while α -ketoglutarate is a co-substrate of the reaction. Lack of HIF1 α degradation in the presence of oxygen was accompanied by a very low α -ketoglutarate/fumarate ratio. Furthermore, treatment with a fumarate analogue prevented HIF1 α degradation

under normoxia. In all, our data suggest that postischemic metabolic alterations in Krebs cycle metabolites impair HIF1 α degradation in the presence of oxygen by decreasing the hydroxylation status of HIF1 α . Besides the well-known effect of oxygen promoting HIF1 α degradation, our results highlight the involvement of metabolic pathways in HIF1 α regulation.

The hypoxia-inducible transcription factor (HIF) is expressed at very low levels in cells under normal oxygen tension, but is rapidly induced upon exposure to hypoxia (1), triggering the activation of a genetic programme that enables the metabolic adaptation of cells (2). HIF is a heterodimeric factor composed of a hypoxia-regulated α subunit (HIF1 α or HIF2 α) and constitutively expressed HIF1 β (also known as aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) (2). Although the α subunit is constantly transcribed and translated, it is also degraded in an oxygen-dependent mechanism. It is only with dwindling oxygen levels that HIF1 α or HIF2 α expression is readily detected (3). In the presence of oxygen, HIF prolyl-hydroxylases (PHD) hydroxylate two proline residues (positions 402 and 564 in human HIF1 α), in a reaction that requires molecular oxygen and α -ketoglutarate as co-substrates (4). These hydroxyproline residues are recognised by the Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (pVHL), one of the components of a E3 ubiquitin-ligase complex that also contains elongins B and C, cullin2 and Rbx, which

conjugates ubiquitin to HIF α (4;5). This results in the oxygen-dependent targeting of HIF α to the proteasome. Decreased oxygen concentration results in impaired prolyl-hydroxylation, reduced targeting of HIF α to the proteasome and the accumulation of HIF in the nucleus, where it activates a plethora of genes devoted to improving the delivery of oxygen and enhancing the production of ATP by glycolysis, among other actions (6).

HIF1 is a key component of the cellular response to brain ischemia (7) and may play role on survival. Thus, permanent MCA¹ occlusion in rats induces a temporal and spatial co-induction of the mRNA of HIF1 α and those of target genes, such as glucose transporter 1 (GLUT1) and glycolytic enzymes (8) in the penumbral area. This is further supported by the increased damage in a model of transient MCA occlusion in mice with neuron-specific inactivation of HIF1 α (9). In contrast, a truncated form of HIF1 α with dominant-negative effects reduced delayed cell death in cultured neurons subjected to OGD (10), through effects on p53 expression (11;12), and HIF1 α -deficient mice were protected against ischemic brain damage (13). However, expression of the majority of hypoxia-dependent genes was unaffected in these mice whereas apoptotic genes were specifically down-regulated, suggesting a predominant pro-apoptotic role of HIF1 α .

Much of the knowledge on the mechanisms that regulate the expression of HIF owing to changing oxygen levels has been obtained from cultured cell models where the availability of glucose was not restricted, and less attention has been comparatively paid to the fact that under ischemia, a shortage of oxygen coincides with a limiting availability of glucose, particularly in cells with low glycogen storage such as neural cells. We hypothesised that the concurrent absence of glucose and oxygen could have a modulating effect on the expression of HIF.

Experimental Procedures

Materials- Dimethylxallyl Glycine (DMOG) was purchased from Cayman Chemical. All-trans retinoic acid (RA) and MG132 were from

Calbiochem. Diethyl ether was purchased from Merck and Ethyl acetate was purchased from J.T. Baker. All other chemicals were purchased from Sigma, whilst tissue culture reagents were ordered from Invitrogen.

Cell Culture- The culture and RA-induced differentiation of SH cells in our model has previously been described (14). The wild type renal cell carcinoma (RCC4) line and a derivative clone stably transfected with an expression vector for pVHL were obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC/Sigma). These cells were grown in low-glucose (5.6 mM) DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, and 500 μ g/mL G418.

Anoxia plus reoxygenation experiments- SH cells seeded on 6 cm Petri dishes (14) were subjected to 15h anoxia either in glucose-containing or glucose-free medium as described (14). This was followed by reoxygenation where indicated, with no intervening change in the media that had been used during the incubation in anoxia. For the experiments performed with RCC4 cells, 10⁵ cells per 6 cm Petri dish were seeded three days before the experiment in 5 ml of the growth medium described above. Just before the experiment, cells were washed once in either growth medium with standard glucose concentration or growth medium prepared with glucose-free DMEM. This volume was aspirated and cells were added another three ml of either of the media and assigned to the glucose-containing or glucose-free groups. Anoxia and reoxygenation were carried out in the same way as for SH cells.

Total cell extracts- At the end of the anoxia and reoxygenation experiments described above, total cell extracts were prepared for the analysis of protein expression by western blotting. The procedure was carried out while keeping the cells on ice at all times. Since cells that had been subjected to OGD conditions were loosely attached to the surface, these were scraped off the dish in a small volume of medium, briefly spun at 4°C, the cell pellet was resuspended in one ml of cold phosphate-buffered saline (PBS), spun again, and finally resuspended in 1.5x Laemmli

sample buffer for SDS-PAGE (150mM Tris-HCl pH 6.8, 1.5% SDS, 15% glycerol, no bromophenol blue) to lyse the cells. Cells that had been kept in control conditions or that had been subjected to anoxia in the presence of glucose were more firmly attached to the surface so cells were washed in PBS whilst still adhered to the Petri dish, and directly lysed with 200 μ l of 1.5X Laemmli sample buffer. All lysates were briefly sonicated in order to reduce their viscosity, and incubated at 100°C for 5'. Protein concentration was quantitated by using the BCA protein assay (Thermo Scientific).

Western blotting- Twenty μ g of protein from total cellular extracts was loaded on SDS-PAGE gels. Western blotting was carried out as previously described (14), except for the detection of the hydroxylated Pro⁵⁶⁴-HIF, where the membrane was blocked overnight at 4°C in 5% skimmed milk in T-TBS, then incubated with the primary antibody (1:1000) for 2.5h at RT in 1% skimmed milk in T-TBS. Detection of the signal in this case was carried out with the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) and a Versadoc imaging system (BioRad). Antibodies raised against the following proteins were used at the dilutions indicated: HIF1 α (Novus Biologicals; NB100-449, 1:2000), HIF1 β (Abcam; ab2771, 1:1000), GLUT1 (Abcam, ab652, 1:1000), Hexokinase II (Santa Cruz Biotechnology; sc-6521, 1:1000), α -actin (Assay Designs/Stressgene; CSA-400, 1: 5000), ATP synthase- β (BD Biosciences; #612518, 1:1000), hydroxy-Pro⁵⁶⁴-HIF (Cell Signalling; #3434, 1:1000), PHD2 (Novus Biologicals; NB100-138, 1:1000), β -tubulin (Sigma; T-4026, 1:50000), GFP (Abcam, ab290, 1:5000).

Quantification of VEGF by ELISA- Secreted VEGF was quantitated in the culture medium of SH cells after incubation under anoxic conditions. This was performed by using the Quantikine Human VEGF Immunoassay (R&D Systems), and according to the manufacturer's instructions. Results were represented as fold activation over the control group.

Quantification of HIF1 α abundance- The Surveyor IC intracellular Human/Mouse total HIF1 α immunoassay (R&D Systems) was used to quantitate HIF1 α expression, according

to the manufacturer's instructions. Extracts were prepared from RA-differentiated SH cells seeded at 3×10^5 cells per six cm Petri dish. A standard curve obtained with known amounts of HIF1 α was run in parallel to the samples in every assay so that expression of HIF1 α could be expressed as pg of HIF1 α per μ g of total cellular protein. Total cellular protein concentration in the lysates was quantitated with Bradford's assay (Bio-Rad laboratories).

HIF1 binding assays- Binding of HIF1 in nuclear extracts to an oligonucleotide containing an HRE was analysed with the TransAM HIF-1 Transcription Factor Assay Kit (Active Motif). SH cells were treated as above. At the end of the experiment, cells were placed on ice and nuclear extracts were prepared according to the manufacturer's instructions with minor modifications. Cells were harvested by scraping and washed once in cold PBS. The cell pellet was resuspended in 400 μ l of a hypotonic solution (10mM HEPES, 10mM KCl, 0.1mM EDTA), kept on ice for 20 min, and Igepal CA-630 was then added to a 0.02% final concentration. The suspension was briefly mixed by inversion and immediately centrifuged at 11,000 g for 1 min at 4°C. The nuclear pellet was resuspended in 50 μ l of the lysis buffer provided in the kit (supplemented with DTT and protease inhibitors provided). Nuclei were incubated for 30 min on ice with occasional mixing by inversion, and centrifuged for 10 min at 14,000 g, 4°C. The supernatant was saved as nuclear extract, and stored in aliquots at -80°C until assayed. Protein content of the extracts was assayed with Bradford's assay (Bio-Rad laboratories).

Transcriptional reporter assays- Relative HIF transcriptional activity was analysed by performing transient transfections into SH cells with a plasmid that expressed firefly luciferase under the control of the basic c-fos promoter and a 29 bp enhancer from the *pfkfb3* gene that contains two HRE, cloned upstream (15). Control vectors included a vector that did not contain an HRE but only the c-fos basal promoter, and another one containing a mutated HRE that does not bind HIF (15). pRL-CMV (Promega), a constitutive expression vector for *Renilla reniformis* luciferase was used to normalise the efficiency

of transfection. For transfection, cells were seeded on 24-well plates at a density of 40,000 cells per well, and allowed to differentiate with RA for 3 days. On the fourth day, a total of one μg of DNA (900 ng of firefly luciferase reporter vector plus 100 ng of pRL-CMV) per well was transfected with Superfect reagent (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. The transfection mix was on the cells for three hours and at the end of the transfection, RA was added back to the medium to resume differentiation for the usual total of five days. Anoxia experiments were performed as described above and lysates were prepared and analysed by using the Dual-Glo kit (Promega), according to the manufacturer's instructions.

Stable transfection- Expression vectors for the fusion proteins Ub-G76V-EGFP (Addgene plasmid 11941) and Ub-M-EGFP (Addgene plasmid 11938) were obtained from N. Dantuma (16) through Addgene. One million SH cells seeded on 10 cm Petri dishes were transfected as described in the preceding section with 10 μg of plasmid and selected with 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 to generate clones with stable expression of either of the vectors.

Metabolite Quantification- Analysis of α -ketoglutarate, succinate and fumarate was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) detection of ketoacids with a method adapted from refs. (17;18). Experiments were performed on SH cells seeded at 3×10^6 in 10 cm Petri dishes, which had been differentiated with 10 μM RA as described (14). At the end of the incubations, cells were washed with PBS and the cell pellet was resuspended in 500 μl of milli-Q water and frozen at -20°C until assayed (a separate fraction was set aside for protein quantification). For the preparation of extracts, the 500 μl samples were taken to a volume of two ml with water, and further added one mL of 8M NaOH and one mL of 25 mg/mL hydroxylamine. The sample was then heated at 60°C for 30 min, and pH was adjusted by adding one mL of 6N HCl. Sequential extractions were carried out as described (18) with the exception that samples were extracted twice with two mL diethyl ether and twice with two mL ethylacetate. Six μL of 5 mM Undecanoic acid was added at the collection

tube to serve as an internal standard of the procedure. Once completely evaporated with nitrogen gas, the final dry residue was resuspended in 75 μl of trimethylsilyl, incubated at 60°C for 30 min to derivatize the keto-acids, and kept at -20°C until injected. Two μL samples were injected into a 7890A-5975C GC-MS (Agilent Technologies), with an HP-5MS 60x 0.25x 0.25 capillary column using a splitless method and pressure ramp, and results were analysed by using the ChemStation GC/MSD software. The ratio between the areas (area of the peak corresponding to each acid and the area of undecanoic acid) was normalised by the protein concentration of the sample ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Statistical Analysis- Data analysis was performed with GraphPad Prism software (GraphPadSoftware), by either one-way ANOVA, followed by post-hoc analysis with Bonferroni Multiple Comparison test; Mann-Whitney non-parametric test; or Krustall-Wallis test for non parametric data followed by a Dunn's multiple comparison test, as indicated in the figure legends.

RESULTS

The availability of glucose during incubation of SH cells under anoxia affects the activation of HIF1 α and its target genes. We examined the expression of HIF1 α protein in total cellular extracts obtained from RA-differentiated SH cells that were incubated for 15h under anoxia in either the presence or the absence of glucose. HIF1 α was not expressed under control conditions but was induced by anoxia (Figure 1A). The induction was more intense in OD conditions than in OGD (Figure 1A). On the other hand, the expression of HIF1 β showed no differences under any of the conditions assayed (Figure 1A). Densitometry of the western blots showed a 4.5-fold higher expression of HIF1 α in the OD than in the OGD group (Figure 1B). Since western blotting only offers semi-quantitative data, we quantitated HIF1 α by ELISA. HIF1 α increased from non-detectable levels under control conditions to 17.3 ± 4.8 pg of HIF1 α per μg of total cellular protein (Figure 1C) under OD. Cells under OGD displayed a much smaller increase

(0.5 ± 0.1 pg of HIF1 α per μ g of total cellular protein, figure 1C). FACS-analysis of cells incubated with pimonidazole during anoxia showed that oxygen availability was similarly reduced in the OD and OGD groups, showing that those differences in HIF1 α expression were not caused by differences in the oxygen concentration available to the cells (Supplementary figure S1). Since the transcriptional effects of HIF1 are dependent on the α/β heterodimer binding to DNA (19), we analysed the binding of HIF1 from nuclear extracts to an oligonucleotide containing an HRE. Our data correlated with the abundance of HIF1 α , with stronger binding to DNA in the presence than in the absence of glucose during anoxia (Figure 1D). The expression of HIF1 α in the same nuclear extracts paralleled the binding results (data not shown), and was in the range of the data presented in figures 1A and 1B. Furthermore, HIF transcriptional activity behaved accordingly with the HIF1 α expression data. Thus, in transient transfection experiments with a luciferase reporter vector under the control of the p $fkfb3$ HRE (wtHRE), the OD caused an approximately 74-fold increase in transcription (Figure 2A). In contrast, cells under OGD conditions only reached seven-fold activation in transcription (Figure 2A). The effects were specifically related to HIF activity since they were abolished when the HRE was mutated (mutHRE, Figure 2A). In keeping with this, we tested the expression of known endogenous HIF transcriptional targets (20). Firstly, we examined the secretion of VEGF into the culture media at the end of anoxia. OD brought about a 24-fold higher secretion of VEGF, and OGD just a 5-fold induction (Figure 2B). Similarly to VEGF, GLUT1 and hexokinase 2 were induced after incubating SH cells under OD, but the absence of glucose in OGD dampened the increase in expression (Figure 2C). Our data support that differences in the expression levels of HIF1 α achieved under OD or OGD correlate with HIF activity and the expression of HIF-target genes.

HIF1 α expressed under OGD conditions is not readily degraded after reoxygenation. Since the availability of glucose affected the abundance of HIF1 α during anoxia, we explored whether any differences may

persist after an additional incubation under normoxic conditions (reoxygenation). Thus, we examined the expression of HIF1 α protein at different times after reoxygenation. HIF1 α was fully degraded one h after reoxygenation following OD (Figure 3A). Unexpectedly, the HIF1 α expressed after OGD was not degraded and was still detectable at least six h after reoxygenation (Figure 3A). This effect was only observed after a long period of OGD (15h), since SH cells subjected to a six h OGD completely degraded HIF1 α within 30 min of reoxygenation (Figure 3B). Furthermore, the persistence of HIF1 α was strictly dependent on the induction of anoxia, since hypoxic conditions of 1.0% oxygen were not able to prevent HIF1 α degradation after reoxygenation (Supplementary figure S2).

The persistence of HIF1 α after reoxygenation is not due to inhibition of proteasome activity. Since the ubiquitin-proteasome pathway is HIF1 α 's main and best characterised degradation system (21), we examined its functionality in our model to see if the stabilisation of HIF1 α could result from inhibition of the proteasome activity. To this end, we generated SH clones with stable expression of a proteasome activity reporter consisting of a ubiquitin-EGFP fusion protein (UbG76V-EGFP SH) (16). The ubiquitin moiety in this reporter contains a gly to val substitution at position 76 that prevents cleavage by ubiquitin hydrolases, so it commits the fusion protein to constitutive proteasomal degradation. Consequently, no EGFP fluorescence was observed under control conditions (Figure 4A, left), but only upon inhibition of the proteasome with MG132 for 15h (Figure 4A, left). The UbG76V-EGFP SH clones were used in experiments such as those described above. The western blotting showed that none of the conditions tested caused the accumulation of a 38 kDa band corresponding to the ubiquitin-EGFP fusion protein (Figure 4B, left), except when the culture media was supplemented with MG132 (Figure 4B, left). A stable SH clone expressing the Ub-M-EGFP fusion protein, which is not degraded in the proteasome owing to rapid excision of the ubiquitin moiety by ubiquitin hydrolases (16;22), was used to control that the expression

of the reporter was not affected by the incubation conditions. This Ub-M-EGFP clone showed no differences in the expression of EGFP in any of the conditions tested (Figure 4B, right). The behaviour of HIF1 α in these cells was like that of the parental SH clone (Figure 4B). Our results indicate that proteasome activity is preserved both under OD and OGD, and that the stability after reoxygenation of HIF1 α induced by OGD cannot be explained by proteasomal inactivation.

The activity of pVHL is required for degradation of HIF1 α after reoxygenation. We next examined the involvement of pVHL in the differential stability of HIF1 α protein after reoxygenation. We subjected RCC4 cells (which do not naturally express pVHL), and a derivative clone over-expressing pVHL from a plasmid (RCC4/pVHL), to OD or OGD, followed by one hour of reoxygenation. The behaviour of HIF1 α expression in the RCC4/pVHL cells was similar to that seen in the SH cells (figure 5, left panel), while in the pVHL-deficient RCC4 cells, HIF1 α was constitutively expressed under normoxia and did not experience the glucose-induced differences in stability after reoxygenation (Figure 5, right panel). This suggests that a) the behaviour of HIF1 α after reoxygenation of the SH cells is not exclusive to this cell line, and b) pVHL is involved in the degradation of HIF1 α after the reoxygenation following a period of anoxia.

The hydroxylation of HIF1 α at reoxygenation after OGD conditions is reduced. The proline hydroxylation catalysed by PHD is crucial for the oxygen-dependent degradation of HIF1 α (4). Thus, we examined whether OGD conditions could lead to impaired hydroxylation of HIF1 α after reoxygenation. Analysis of total cellular extracts by Western blotting with an antibody specifically recognising hydroxy-Pro⁵⁶⁴ in human HIF1 α showed large differences in the proportion of hydroxylated-HIF1 α . One hour of reoxygenation after OD in the presence of the proteasome inhibitor MG132 (to prevent the rapid degradation of HIF1 α after reoxygenation) produced a higher proportion of hydroxylated HIF1 α than after OGD (Figure 6).

When the PHD inhibitor DMOG was added instead of MG132, the oxygen-dependent hydroxylation of HIF1 α after OD was inhibited and HIF1 α was not degraded (Figure 6). We hypothesised that the oxygen-dependent hydroxylation of HIF1 α was impaired after a long period of OGD. This could be caused either by a reduction of PHD enzyme activity/abundance or by changes in the availability of substrates or inhibitors affecting this reaction. We first tested whether the abundance of PHD2, the main isoform involved on HIF1 α hydroxylation (23) was affected by OGD and we found it was not the case (Figure 6). Under our conditions, the physical diffusion of atmospheric oxygen into the medium at reoxygenation seems to be a rapid process, based on the fast disappearance of HIF1 α during reoxygenation of the glucose-treated group (Figure 3 and supplementary figure S3, as well as previous data (1)). Thus, it is unlikely that oxygen availability could be limiting during reoxygenation after OGD.

Altered levels of Krebs cycle metabolites after OGD might limit HIF1 α hydroxylation in the presence of oxygen. The hydroxylation reaction catalysed by PHD2 also depends on α -ketoglutarate as co-substrate, and its activity has been shown to be inhibited by metabolites of the tricarboxylic cycle such as succinate (which is also the product of the hydroxylation reaction) and fumarate, the latter being the most effective as an inhibitor (24;25). Thus, we carried out GC-MS analysis on extracts prepared from SH cells to quantitate the relative abundance of α -ketoglutarate, succinate and fumarate at one h of reoxygenation after a 15 h treatment under OD or OGD. Our data showed that the abundance of α -ketoglutarate and succinate was significantly reduced in the OGD group relative to control (figures 7A and 7B). While OD reduced the hydroxylation inhibitor fumarate, the abundance of fumarate after OGD tended to be even higher than in controls (Figure 7C). The abundance of α -ketoglutarate or succinate in the OD group was not significantly different from the control group. The ratio (mean \pm SEM) α -ketoglutarate/fumarate was 0.0065 \pm 0.0015 in controls. This value was significantly reduced (one way ANOVA, $p < 0.05$) in OGD

(0.0015±0.0005), while it was not statistically different from control in OD (0.0097±0.0030). The lower ratio between α -ketoglutarate (reaction substrate) and fumarate (inhibitor) in the OGD group prompted us to speculate whether these metabolites would play a role in the stabilisation of HIF1 α by inhibiting HIF1 α hydroxylation. Thus, we treated SH cells for six hours with 20 mM monoethyl fumarate (me-f, figure 7D) in the presence of glucose under normoxia, in order to increase the intracellular availability of fumarate (26). Western blot analysis showed that the treatment with me-f prevented HIF1 α degradation under normoxic conditions (Figure 7D). In all, our data indicate that alterations in the abundance of metabolites could play a regulatory role in the expression of HIF1 α , and could partly contribute to the glucose-dependent differences in HIF1 α stability at reoxygenation.

DISCUSSION

Our study shows that the induction of HIF1 α protein during anoxia is strongly affected by the prolonged absence of glucose in neuroblastoma cells. The effects of the absence of glucose are manifested in two ways: a) by diminished induction and reduced transcriptional effects of HIF1 α , and b) by the acquired resistance of HIF1 α against the oxygen-induced degradation. According to these results, severe ischemia is expected to induce a lower transcriptional activity of HIF1 α than mild ischemia or hypoxia. Moreover, oxygen availability at reperfusion after severe ischemia might not induce rapid HIF1 α degradation, whereas oxygen will readily induce full degradation of HIF1 α after a period of mild ischemia or hypoxia. Our results confirm and extend previous observations by Vordermark et al., who described a full activation of HIF1 α expression in tumour cell lines only in the presence of glucose during hypoxia, which helped to explain the previously observed uncoupling between HIF1 α expression and hypoxic areas in solid tumours (27). It stands to reason there may be a feedback mechanism to prevent the HIF-mediated up-regulation of glycolytic enzymes when no glucose is available, since no immediate benefit would

derive from it and may otherwise contribute to deplete the already strained cellular energy stores.

Several lines of evidence suggest that the serine-threonine kinase mammalian target of rapamycin (mTOR) may bridge glycolytic flux and the expression of HIF1 α . This kinase is part of a multi-protein complex named mTORC1 that receives input from mitogenic as well as energy-sensing pathways and, in turn, promotes protein synthesis and cell growth (28). This complex has also been put forward as a positive regulator of HIF1 α function (29;30). Our results agree with a previous report that also described decreased HIF1 α expression during OGD (31) and suggested this might be due to inhibition of mTOR signalling by increased AMPK activity. Other evidences support a negative role of AMPK for HIF1 α expression (32). We know that in our experimental model, ATP reduction is more severe after OGD than after OD (14), so it is plausible that AMPK activity could be higher under OGD conditions, as described by Laderoute et al. (33). Nevertheless, there may also be mTORC1 inhibition in the absence of glucose that is independent of AMPK (34). Thus, whether an AMPK-dependent or independent mechanism lies behind the reduced levels of expression of HIF1 α in our OGD model should deserve separate investigation.

We report how the HIF1 α protein that is expressed under conditions of OGD displays resistance against the reoxygenation-induced degradation that otherwise occurs in the presence of glucose. This phenomenon was not due to inhibition of the general process of protein degradation in the proteasome but seemed to be due to decreased prolyl-hydroxylation of HIF1 α . This effect occurred alongside alterations in the abundance of tricarboxylic cycle metabolites (low α -ketoglutarate/fumarate ratio) that are directly involved in the regulation of PHDs (25). Despite the effects of such metabolites have been studied in heritable alterations of tricarboxylic acid cycle enzyme expression and in cancer (24;26), we are not aware of other studies like ours where metabolic regulation induced by environmental changes correlated with HIF1 α stability through control of prolyl-

hydroxylation. Thus, in our study, OGD conditions caused significantly diminished abundance of α -ketoglutarate and succinate relative to control cells. The α -ketoglutarate data coincide with a study by Robert Vanucci's group in the early 90's that reported decreased abundance of α -ketoglutarate after ischemia in rat brain (35). On the other hand, we found in our model that fumarate abundance was higher at reoxygenation after OGD than after OD, and that the α -ketoglutarate/fumarate ratio was greatly reduced after OGD versus OD or control conditions (Figure 7C). In our cells, an increase in fumarate intracellular abundance by supplementation of the medium with monoethyl fumarate caused the up-regulation of HIF1 α under normoxic conditions (Figure 7D), which, according to the literature, would be caused by inhibition of hydroxylases targeting HIF1 α (25;26). The observed changes in metabolite abundance induced by OGD, results in an substrate/inhibitor ratio that would be less favourable for HIF1 α hydroxylation. In keeping with this, previous data indicate that induction of HIF1 α expression in normoxia by monoethyl-fumarate can be reverted by supplementation with a membrane-permeable form of α -ketoglutarate (26).

Regarding the possible role of the extended expression of HIF1 α beyond reoxygenation after OGD, a recent report by Filiano and colleagues has shown how transglutaminase 2, which is increased after subjecting RA-differentiated SH cells to OGD and is protective against OGD-induced cell death (36), binds HIF1 β and dampens HIF1 transcriptional effects (36). The evidence provided in that report suggests that HIF1 expression induced by OGD would play a detrimental role in SH cell survival. This is controversial, since HIF1 α inhibition caused negative effects on the survival of SH cells to an ischemic insult followed by reoxygenation,

owing to a shift in the cellular redox environment towards a more oxidising state (37). Building on those reports and in concordance with data presented in our previous publication (14), it is tempting to speculate that the low-key sustained expression of HIF1 α after OGD and reoxygenation may partly account for the activation of the genetic programme that leads to OGD-induced delayed cell death in our model. Nevertheless, proper demonstration of this hypothesis lies beyond the scope of this manuscript, and shall await further research.

In conclusion, we present data suggesting that HIF1 α protein expression could be regulated by changes in cellular metabolism that reflect environmental cues. In one hand, HIF1 α would be regulated by a mechanism purely dependent on the presence of oxygen, which in the presence of glucose, would result in a high level of activation of HIF1 α and enhancement of ATP production by glycolysis with rapid clearance of HIF1 α after reoxygenation when aerobic metabolism is resumed. On the other hand, our results support the involvement of another mechanism driven by alterations in the abundance of tricarboxylic acid cycle metabolites that would restrain the expression of HIF1 α in the absence of both oxygen and glucose, thus preventing unnecessary activation of glycolysis. This mechanism would maintain HIF1 activity at reoxygenation while the metabolic profile remains altered. Our findings lend further support to the idea that it might be possible to regulate HIF1 α expression up to a certain extent independently of oxygen levels by coupling metabolism and prolyl-4-hydroxylase activity (38;39), in metabolic contexts that may extend beyond the range of situations where the effects of metabolites on HIF1 α expression have been successfully explored so far (24;26;40).

REFERENCES

1. Jewell, U. R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R. H., and Gassmann, M. (2001) *FASEB J.* **15**, 1312-1314
2. Semenza, G. L. (2009) *Semin.Cancer Biol.* **19**, 12-16
3. Berra, E., Roux, D., Richard, D. E., and Pouyssegur, J. (2001) *EMBO Rep.* **2**, 615-620

4. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) *Science*. **292**, 468-472
5. Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., and Poellinger, L. (2000) *EMBO J*. **19**, 4298-4309
6. Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., and Semenza, G. L. (1998) *Genes Dev*. **12**, 149-162
7. Sharp, F. R., Bergeron, M., and Bernaudin, M. (2001) *Adv.Exp.Med.Biol*. **502**, 273-291
8. Marti, H. J., Bernaudin, M., Bellail, A., Schoch, H., Euler, M., Petit, E., and Risau, W. (2000) *Am.J Pathol*. **156**, 965-976
9. Baranova, O., Miranda, L. F., Pichiule, P., Dragatsis, I., Johnson, R. S., and Chavez, J. C. (2007) *J.Neurosci*. **27**, 6320-6332
10. Halterman, M. W., Miller, C. C., and Federoff, H. J. (1999) *J Neurosci*. **19**, 6818-6824
11. 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 Keshert, E. (1998) *Nature*. **394**, 485-490
12. Banasiak, K. J. and Haddad, G. G. (1998) *Brain Res*. **797**, 295-304
13. Helton, R., Cui, J., Scheel, J. R., Ellison, J. A., Ames, C., Gibson, C., Blouw, B., Ouyang, L., Dragatsis, I., Zeitlin, S., Johnson, R. S., Lipton, S. A., and Barlow, C. (2005) *J Neurosci*. **25**, 4099-4107
14. Serra-Perez, A., Verdaguer, E., Planas, A. M., and Santalucia, T. (2008) *J Neurochem*. **106**, 1237-1247
15. Obach, M., Navarro-Sabate, A., Caro, J., Kong, X., Duran, J., Gomez, M., Perales, J. C., Ventura, F., Rosa, J. L., and Bartrons, R. (2004) *J Biol Chem*. **279**, 53562-53570
16. Dantuma, N. P., Lindsten, K., Glas, R., Jellne, M., and Masucci, M. G. (2000) *Nat Biotechnol*. **18**, 538-543
17. Tanaka, K., West-Dull, A., Hine, D. G., Lynn, T. B., and Lowe, T. (1980) *Clin Chem*. **26**, 1847-1853
18. Ribes, A., Riudor, E., Briones, P., Christensen, E., Campistol, J., and Millington, D. S. (1992) *J Inherit. Metab Dis*. **15**, 367-370
19. Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., and Semenza, G. L. (1996) *J Biol Chem*. **271**, 17771-17778
20. Rankin, E. B. and Giaccia, A. J. (2008) *Cell Death Differ* **15**, 678-685
21. Mole, D. R., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., and Ratcliffe, P. J. (2001) *IUBMB.Life*. **52**, 43-47
22. Johnson, E. S., Ma, P. C., Ota, I. M., and Varshavsky, A. (1995) *J Biol Chem*. **270**, 17442-17456
23. Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., and Pouyssegur, J. (2003) *EMBO J*. **22**, 4082-4090
24. Selak, M. A., Armour, S. M., MacKenzie, E. D., Boulahbel, H., Watson, D. G., Mansfield, K. D., Pan, Y., Simon, M. C., Thompson, C. B., and Gottlieb, E. (2005) *Cancer Cell*. **7**, 77-85
25. Koivunen, P., Hirsila, M., Remes, A. M., Hassinen, I. E., Kivirikko, K. I., and Myllyharju, J. (2007) *J Biol Chem*. **282**, 4524-4532
26. Isaacs, J. S., Jung, Y. J., Mole, D. R., Lee, S., Torres-Cabala, C., Chung, Y. L., Merino, M., Trepel, J., Zbar, B., Toro, J., Ratcliffe, P. J., Linehan, W. M., and Neckers, L. (2005) *Cancer Cell* **8**, 143-153
27. Vordermark, D., Kraft, P., Katzer, A., Bolling, T., Willner, J., and Flentje, M. (2005) *Cancer Lett*. **230**, 122-133
28. Dunlop, E. A. and Tee, A. R. (2009) *Cellular Signalling* **21**, 827-835

29. Hudson, C. C., Liu, M., Chiang, G. G., Otterness, D. M., Loomis, D. C., Kaper, F., Giaccia, A. J., and Abraham, R. T. (2002) *Mol Cell Biol.* **22**, 7004-7014
30. Land, S. C. and Tee, A. R. (2007) *J Biol Chem.* **282**, 20534-20543
31. Zhou, J., Hara, K., Inoue, M., Hamada, S., Yasuda, H., Moriyama, H., Endo, H., Hirota, K., Yonezawa, K., Nagata, M., and Yokono, K. (2008) *Kobe J Med.Sci.* **53**, 283-296
32. Shackelford, D. B., Vasquez, D. S., Corbeil, J., Wu, S., Leblanc, M., Wu, C. L., Vera, D. R., and Shaw, R. J. (2009) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **106**, 11137-11142
33. Laderoute, K. R., Amin, K., Calaoagan, J. M., Knapp, M., Le, T., Orduna, J., Foretz, M., and Viollet, B. (2006) *Mol.Cell.Biol.* **26**, 5336-5347
34. Lee, M. N., Ha, S. H., Kim, J., Koh, A., Lee, C. S., Kim, J. H., Jeon, H., Kim, D. H., Suh, P. G., and Ryu, S. H. (2009) *Mol.Cell.Biol.* **29**, 3991-4001
35. Yager, J. Y., Brucklacher, R. M., and Vannucci, R. C. (1991) *Am.J Physiol.* **261**, H1102-H1108
36. Filiano, A. J., Bailey, C. D., Tucholski, J., Gundemir, S., and Johnson, G. V. (2008) *FASEB J.* **22**, 2662-2675
37. Guo, S., Miyake, M., Liu, K. J., and Shi, H. (2009) *J Neurochem.* **108**, 1309-1321
38. Aragonés, J., Fraisl, P., Baes, M., and Carmeliet, P. (2009) *Cell Metab.* **9**, 11-22
39. Boulahbel, H., Duran, R. V., and Gottlieb, E. (2009) *Biochem.Soc.Trans.* **37**, 291-294
40. Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zha, Z., Wang, P., Yu, W., Li, Z., Gong, L., Peng, Y., Ding, J., Lei, Q., Guan, K. L., and Xiong, Y. (2009) *Science* **324**, 261-265

FOOTNOTES

*We thank Ramon Bartrons (University of Barcelona, Spain) and Nico Dantuma (Karolinska Institute, Sweden) for providing the p_{pkfb}3HRE-Luc and Ub-GFP reporter constructs, respectively. We are grateful to Jaume Comas (Serveis Científics i Tècnics, Universitat de Barcelona) for his help on flow cytometry experiments. A.S-P. is recipient of a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya, Spain. A.N.O'M. is supported by a FPI fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia. T.S. held a Ramón y Cajal scientist contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) and is currently a participant of the Program for Stabilisation of Investigators from the "Direcció d'Estratègia i Coordinació del Departament de Salut" from the Generalitat de Catalunya. This work was funded by projects from MICINN (projects SAF2005-05793-C02-02 and SAF2008-04515-C02-02). E.B. is funded by the Grant SAF2007-64597, the ETORTEK Research Program and the Bizkaia Xede Program from Bizkaia County.

¹Abbreviations used: MCA: middle cerebral artery, HRE: hypoxia-response element, VEGF: vascular endothelial growth factor, EGFP: enhanced green fluorescent protein, AMPK: AMP-activated protein kinase.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The absence of glucose during anoxia blunts the increase in HIF1 expression and binding to DNA. *A.* Western blot showing the relative expression of HIF1 subunits α and β in total extracts prepared from cells treated under anoxia for 15h in either the presence (OD: glucose +, anoxia +) or absence of glucose (OGD: glucose -, anoxia +), or under control conditions (glucose +, anoxia -). The membrane was re-blotted with an antibody against α -actin to control equal loading. *B.* Quantification of HIF1 α by densitometry of western blots. Data were expressed as fold change relative to the OGD group and are represented as the average \pm SEM of 10 to 17 independent experiments. Statistical analysis was by one-way ANOVA followed by Mann-Whitney post-test. OD vs. OGD, * $p < 0.05$. *C.* ELISA quantification of HIF1 α in total cell extracts prepared from SH cells treated as above for the same period of time, as indicated. Data were expressed as pg of HIF1

per μg of total cellular protein and are represented as the average \pm SEM of seven independent experiments. Statistical analysis was by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. *N.D.*: not detectable; OD vs. OGD, ** $p < 0.01$. *D.* Relative binding of HIF1 in nuclear extracts prepared from cells treated as above to an oligonucleotide containing an HRE. Data were normalised by the total protein content, expressed relative to the value of the control group and are represented as the average of four independent experiments \pm SEM. Statistical analysis was by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. OD vs. OGD, ** $p < 0.01$.

Figure 2. OGD reduces HIF-mediated transcription and dampens the induction of HIF1 target genes. *A.* Quantification of the relative HIF transcriptional activity in transient transfection experiments with an HRE-dependent luciferase reporter (wtHRE) in SH cells. A vector containing a mutant HRE (mutHRE) was used as a negative control. Results were normalised by Renilla luciferase activity and expressed as fold activation relative to the control group. Data are represented as the average \pm SEM of five independent experiments, and were analysed by one-way ANOVA followed by Bonferroni test. OD (O_2^- , G+) vs. control (O_2^+ , G+), or OD vs. OGD (O_2^- , G-) *** $p < 0.001$. *B and C.* Induction of HIF targets (VEGF, hexokinase II, GLUT1) as a consequence of the treatments described above. Secreted VEGF was detected by ELISA, whereas hexokinase II and GLUT1 in total cellular extracts were detected by immunoblotting. VEGF data were normalised by the value of the control condition and were expressed as relative abundance. Data are represented as the average \pm SEM of four independent experiments, and were analysed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test (** $p < 0.01$).

Figure 3. HIF1 α produced during OGD becomes resistant to degradation even after reoxygenation. *A.* The expression of HIF1 α protein was assessed by immunoblotting in total cell extracts prepared from cells incubated either in control conditions (anoxia -, glucose +), or for 15h in OD (15h anoxia, glucose +) or OGD (15h anoxia, glucose -) conditions, followed by one, three or six h after reoxygenation, as indicated. *B.* Expression of HIF1 α in cells incubated under anoxia for 6h in the presence or absence of glucose and 30 min after reoxygenation. Blots in both panels were also probed with the α -actin antibody to provide a control of the protein loading.

Figure 4. The resistance of HIF1 α to oxygen is not due to impaired proteasome activity. *A.* Cells expressing either the proteasome activity reporter Ub-G76V-EGFP (left panels) or the control reporter Ub-M-EGFP (right panels) were incubated for 15 h in the presence or absence of proteasome inhibitor MG132 (10 μM), as indicated. Micrographs show fluorescence of EGFP (EGFP) or a phase-contrast image of the same field (PC). *B.* Detection of the Ub-G76V-EGFP (left panels) or Ub-M-EGFP (right panels) reporters with an antibody against GFP by immunoblotting of total cellular extracts prepared in the conditions indicated. Media were supplemented with 10 μM MG132 as indicated. The white arrowhead (left panels) indicates the position of the Ub-G76V-EGFP fusion protein. Increased expression of the fusion protein owing to inhibition of the proteasome allows low-efficiency cleavage of the ubiquitin moiety and detection of free EGFP (black arrowhead, (16)). An unidentified band of lower molecular weight was also detected (asterisk). The right panel shows constitutive expression of free EGFP in the clone expressing the Ub-M-EGFP fusion protein. As a control, HIF1 α was detected on the same blots. They were also probed with an antibody against tubulin- β to provide a loading control.

Figure 5. The activity of pVHL is required for degradation of HIF1 α after reoxygenation. The expression of HIF1 α protein was analysed in wild type RCC4 cells (which lack pVHL, right panel) and a clone transfected with a plasmid expressing pVHL to rescue the mutation (RCC4/pVHL, left panel). The two clones were subjected to control, OD, or OGD conditions for 15h. The blots were probed with the α -actin antibody to provide a loading control.

Figure 6. The hydroxylation of HIF1 α is reduced after OGD followed by one hour of reoxygenation. Detection of hydroxy-Pro⁵⁶⁴-HIF1 α by immunoblotting of total cellular extracts prepared from SH cells one hour after reoxygenation following OD (glucose +) or OGD (glucose -) for 15h, as indicated. Supplementation of the medium with 10 μ M MG132 prior to anoxia prevented HIF1 α degradation following reoxygenation after OD treatment and allowed detection of hydroxylation under this condition. PHD inhibitor DMOG (1 mM) was added prior to anoxia to a separate dish to control for the specificity of the signal. Total HIF1 α and PHD2 protein levels were subsequently measured on the same blot. ATP synthase- β (ATPS- β) was used to control for equal loading.

Figure 7. OGD induces alterations in tricarboxylic acid (TCA) cycle metabolites that may affect HIF1 α hydroxylation and expression. Intracellular levels of some TCA cycle metabolites that may affect HIF1 α expression: α -ketoglutarate (*A*), succinate (*B*) and fumarate (*C*), were detected by GC-MS (see methods) in the conditions indicated. Normalised data were expressed relative to the abundance of the control group, and are shown as the average \pm SEM of 7 independent experiments. Data on α -ketoglutarate (*A*, OGD vs. control, * $p < 0.05$) were analysed by Kruskal Wallis test for non-parametric data followed by a Dunn's multiple comparison test, while succinate (*B*, OGD vs. control, *** $p < 0.005$) and fumarate levels (*C*, OD vs. control, ** $p < 0.01$) were analysed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. *D*. Supplementation of the medium with 20 mM monoethyl fumaric acid was enough to increase HIF1 α expression in cells under control conditions. An OGD sample was included as a positive control. ATP synthase- β was used as a loading control.

Figure 1

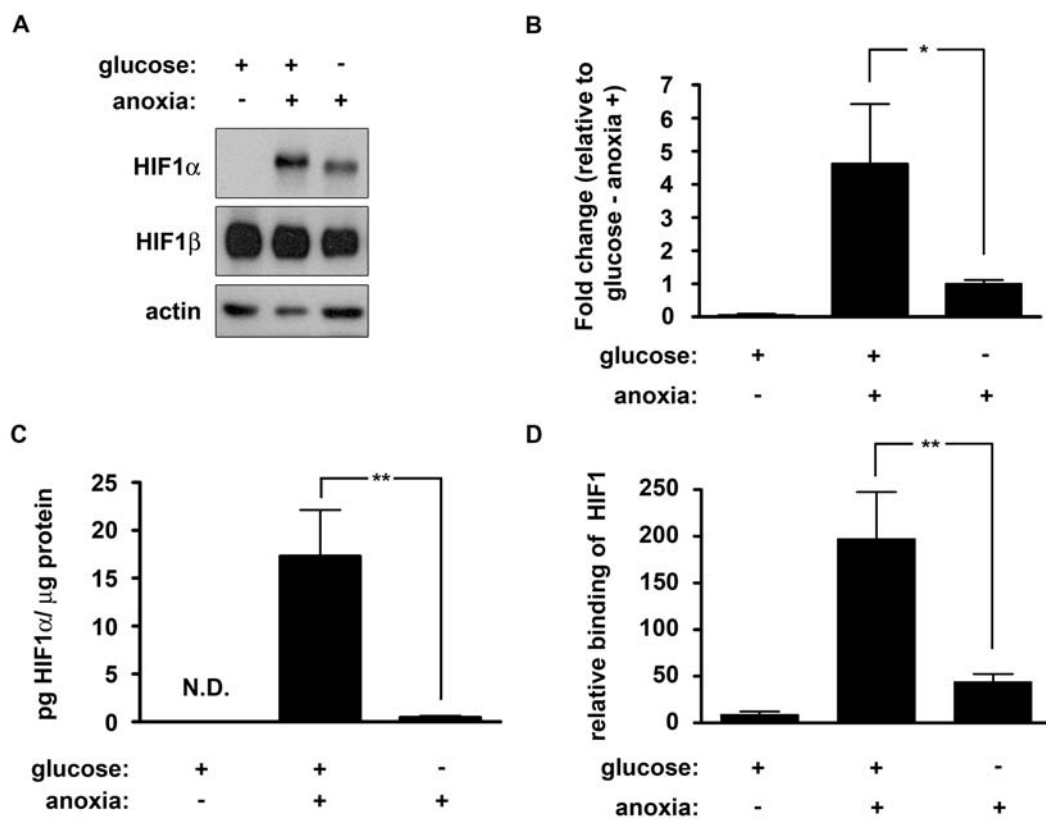


Figure 2

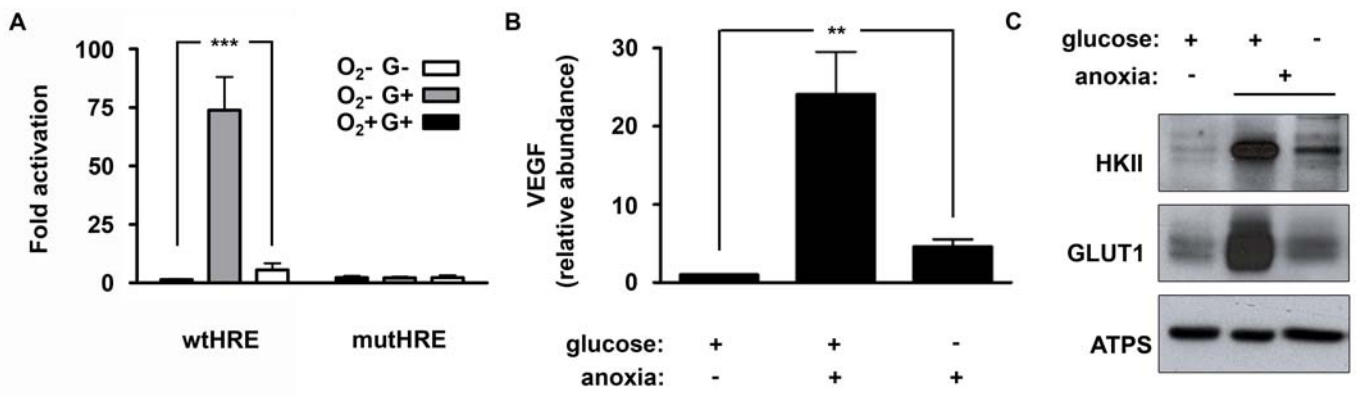


Figure 3

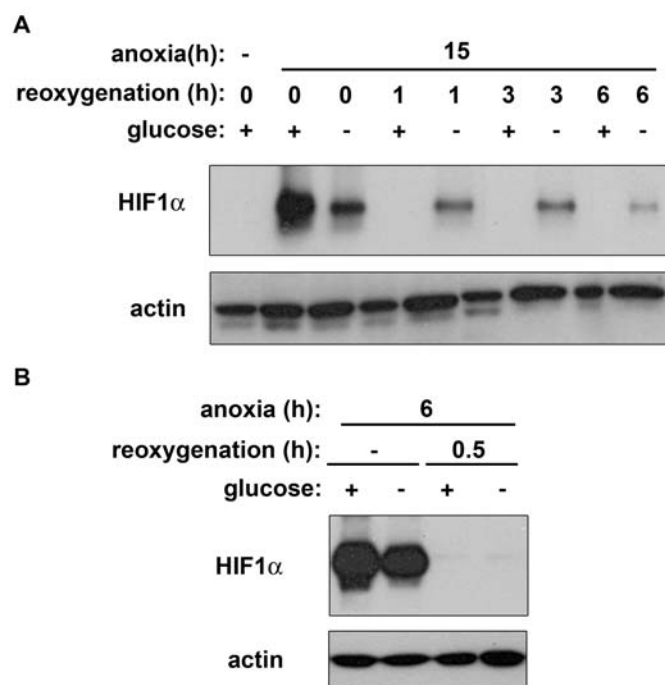


Figure 5

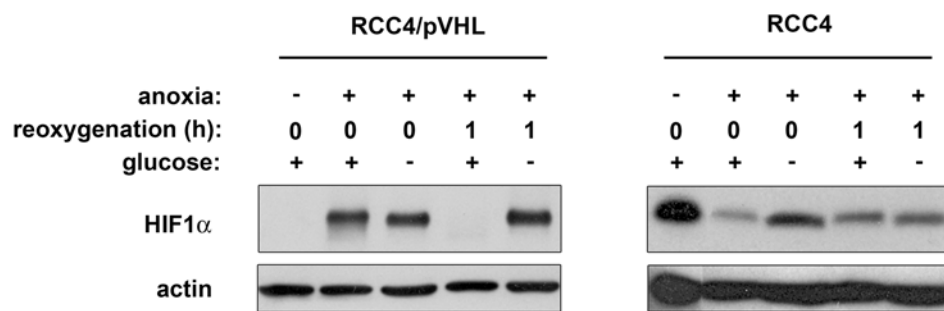


Figure 6

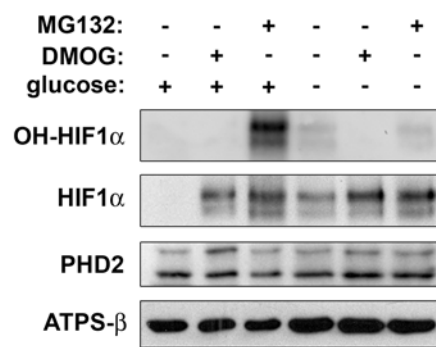
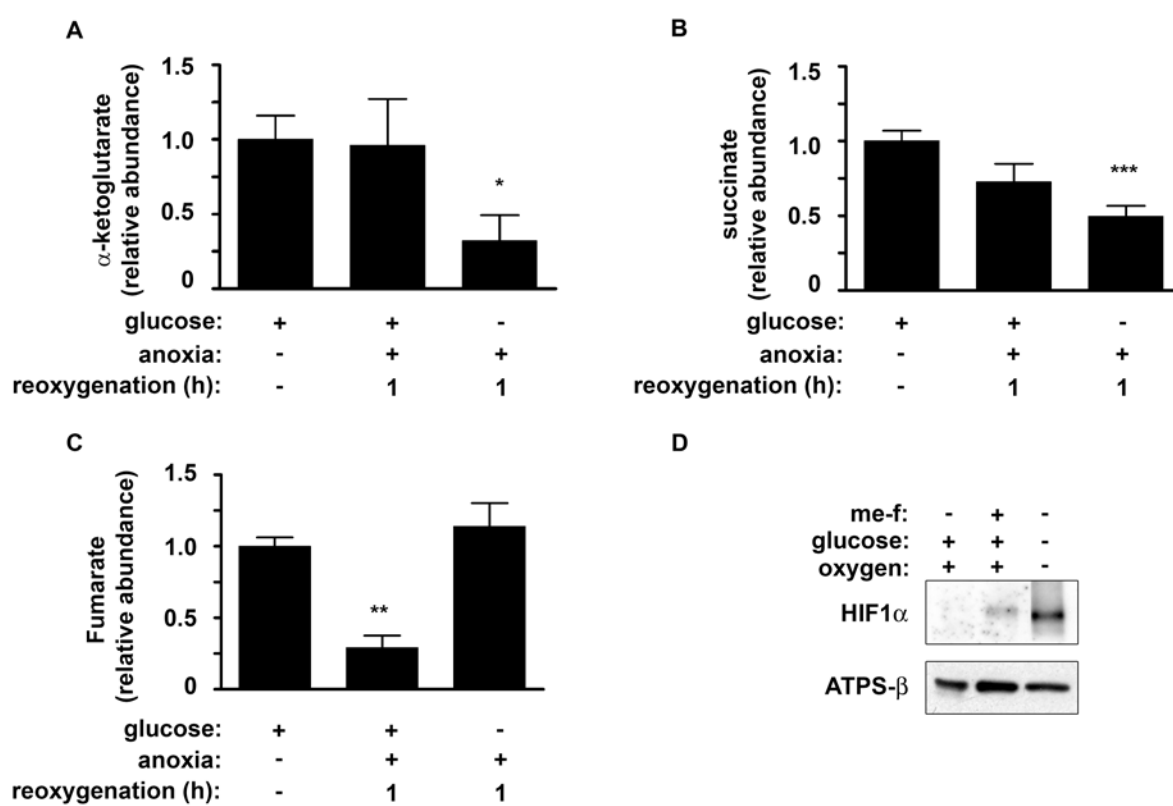


Figure 7



SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary figure S1. Formation of pimonidazole adducts is not significantly different between OD and OGD treatments. SH cells were incubated under anoxia for 15h in either the presence (OD) or absence (OGD) of glucose, or kept under control conditions (anoxia -, glucose +). Pimonidazole hydrochloride was included in the media prior to the start of the incubation under anoxia, and the formation of pimonidazole adducts as a consequence of hypoxia was measured by flow cytometry of the cells (see supplementary methods). Data were expressed as relative fluorescence intensity and are shown as the mean \pm SD of three independent experiments. Data analysis was carried out by ANOVA followed by Bonferroni post-test (Control vs. OD or OGD, ** $p < 0.01$; OD vs. OGD, ns: no significant difference).

Supplementary figure S2. HIF1 α degradation at reoxygenation is not prevented after an OGD incubation carried out at 1.0% O₂. Hypoxia experiments were carried out as described in figure 3A, with the exception that 1.0% O₂ was used instead of the anoxic mixture. HIF1 α expression was quantitated by immunoblotting in total cellular extracts at the indicated times (right at the end of the hypoxia phase or after one h reoxygenation).

Supplementary figure S3. The degradation of HIF1 α at reoxygenation after incubation under OD conditions is very fast. Anoxia experiments were carried out as described in figure 3A, except that HIF1 α expression was studied at shorter times of reoxygenation (3, 8 and 20 min) in order to estimate the celerity in the degradation of HIF1 α when cells were reoxygenated after 15h of incubation under OD conditions (glucose +). This is in contrast to the stability of HIF1 α expression displayed by cells that were incubated for the same periods of time under OGD conditions (glucose -).

SUPPLEMENTARY METHODS

Pimonidazole staining

The detection of pimonidazole adducts after anoxia was carried out by using a Hypoxyprobe-1 plus kit (HPI inc, Burlington, MA). The protein adducts of reductively-activated pimonidazole were detected by flow cytometry. Pimonidazol Hydrochloride provided in the kit was added just before the onset of anoxia (75 μ M in saline solution). At the end of anoxia cells were collected, washed, fixed with a mixture of PBS and 70% ethanol as previously described (Serra-Pérez et al) and frozen at -20° C. Samples were blocked and incubated with FITC-labelled antipimonidazole provided in the kit as described (1). Cells were washed and relative FITC intensity was detected on FL1 (green fluorescence) in a Coulter Epics XL flow cytometer (Beckman-Coulter Corporation/IZASA, Barcelona, Spain).

Supplementary hypoxia experiments

For experiments involving 1% oxygen concentration, either an Invivo400 hypoxia workstation (Ruskin/Cultek, Madrid, Spain) or a GalaxyR hypoxia incubator (RSBiotech/Cultek, Madrid, Spain) were used essentially as previously described (2;3).

Supplementary references

1. Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., and Denko, N. C. (2006) *Cell Metab* **3**, 187-197
2. Ginouves, A., Ilc, K., Macias, N., Pouyssegur, J., and Berra, E. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 4745-4750
3. Serra-Perez, A., Verdaguer, E., Planas, A. M., and Santalucia, T. (2008) *J Neurochem.* **106**, 1237-1247

DISCUSSIÓ

6. DISCUSSIÓ:

La isquèmia cerebral cursa amb privació de glucosa i oxigen. Això succeeix en graus diferents quan parlem de *penombra* i *nucli* de l'infart cerebral. Per a l'estudi de l'ictus existeixen múltiples models centrats en els diferents fenòmens que succeeixen en un episodi isquèmic. El model de privació de glucosa i oxigen es centra en la caiguda energètica i en la disfunció mitocondrial i del metabolisme oxidatiu. Aquesta tesi està centrada en l'estudi d'un model d'isquèmia *in vitro* basat en la privació d'oxigen i de glucosa (OGD) o la privació exclusivament d'oxigen (OD) en una línia cel·lular derivada de cèl·lules de neuroblastoma humà (SH-SY5Y) diferenciades amb àcid retinoic. S'han estudiat la mort cel·lular i la inducció i regulació del factor de transcripció de resposta a hipòxia HIF1 durant la fase d'anòxia i la posterior reoxigenació.

La línia cel·lular comporta avantatges en la manipulació, i en l'ampli ventall de tècniques possibles, alhora que la seva diferenciació aproxima els resultats a estudis de cultius primaris. Molts estudis han treballat amb les cèl·lules SH-SY5Y diferenciades, podent variar la concentració de RA i la durada de l'exposició (Cheung et al., 2009; Ohno et al., 2007; Shen et al., 2007; Kim et al., 2005).

La durada i severitat de la hipòxia depèn del tipus cel·lular. Les cèl·lules SH-SY5Y són sensibles a la hipòxia, però requereixen períodes d'anòxia molt llargs per a observar efectes morfològics i repercussió en la viabilitat, fet que pensem que podria ser degut a nivells més elevats de reserves energètiques respecte cultius primaris de neurones, que són molt més sensibles a la hipòxia tal com s'ha descrit prèviament (Culmsee et al., 2005) i hem constatat en el nostre model. No obstant, no n'hem determinat els nivells intracel·lulars de glicógen. En el cas d'astròcits, per exemple, es requereixen estímuls més prolongats (3-6h.) donada la seva resistència a la hipòxia, perquè s'adaptin al metabolisme anaeròbic (Orellana et al., 2010).

Tot i l'estímul hipòxic perllongat s'observa una molt baixa taxa de mortalitat en acabar la hipòxia, probablement vinculada a la resistència d'aquestes cèl·lules a l'anòxia, i la mortalitat es troba principalment en la reoxigenació. Existeixen interconnexions entre les vies de mort cel·lular apoptòtiques i necròtiques (Lankiewicz et al., 2000; Polster et al., 2005) i podria ser que aquest fet expliqués la mort en presència de glucosa associada a calpaïna determinada amb mètodes centrats en la detecció d'apoptosi.

Paral·lelament determinem una mort activada per caspases només present en la reoxigenació en presència de glucosa. S'ha descrit la inducció de mort apoptòtica dependent de caspases i necròtica en cultius de neurones corticals de rata exposats a OGD (Le et al., 2002). L'increment de la caspasa 3 i la seva activació s'han detectat en models animals d'isquèmia cerebral i en pacients d'ictus (Broughton et al., 2009) i la seva deficiència es vincula a resistència al dany isquèmic *in vivo* i *in vitro* (Le et al., 2002). En el nostre estudi hem corroborat el mateix fenomen apoptòtic d'activació de caspasa 3 induït per la presència de glucosa en la línia cel·lular i en cultius neuronals.

La duració de la fase d'hipòxia no només és rellevant per a la inducció de mort, sinó que també influeix en el tipus de mort. L'aportació de fenomen apoptòtic és dependent de la severitat i durada de l'estímul. En períodes llargs d'OGD sembla que s'incrementa el percentatge de necrosi (Malagelada et al., 2005). En el nostre estudi només determinem activitat caspasa en presència de glucosa en la reoxigenació, però es manté una activitat remanent de calpaïna associada a necrosi.

Donat que l'ictus presenta diverses vies d'activació de mort cel·lular i al nostre model també hi està present l'activació de caspases i calpaïnes creiem que és un model útil per a l'estudi de la mort cel·lular en aquest context.

La glucosa té un paper diferencial dependent de la seva presència en la fase d'anòxia o reoxigenació. Mentre en la fase d'anòxia la presència de glucosa sembla potenciar la viabilitat i permetre l'adaptació cel·lular a la hipòxia, la glucosa en la reoxigenació posterior a OGD incrementa el percentatge de mort global i indueix a l'activació de caspases i a la mort apoptòtica.

Molts estudis han descrit el que s'anomena "la paradoxa de la glucosa" (Schurr et al., 2002). Estudis clínics han determinat pitjor pronòstic (Capes et al., 2001) i major volum d'infart (Alvarez-Sabin et al., 2003) per a pacients hiperglicèmics no diabètics. Estudis *in vivo* en animals determinen el paper negatiu de la glucosa en la isquèmia: s'incrementa la producció de lactat i de ROS, la resposta inflamatòria (Lin et al., 2000), l'alliberació de glucocorticoides, les glicosilacions i la infiltració de neutròfils (Martin et al., 2006). Dependent de la durada de l'anòxia, s'indueixen hemorràgies més severes perquè altera la resposta vascular (anòxies llargues) o causa alteracions més aviat metabòliques (breus). En cultius d'astròcits, nivells elevats de glucosa durant la hipòxia incrementen la mortalitat: del 20% per a concentracions de glucosa 5mM al 50% per a 27mM (Orellana et al., 2010). No obstant encara no s'ha

determinat la causa directa. La hiperglicèmia doncs sembla que té un efecte negatiu, no obstant en el nostre treball hem volgut estudiar el paper de la glucosa *per se* en relació a la mort cel·lular en condicions no molt allunyades de la normoglicèmia.

S'ha descrit que AIF transloca al nucli de neurones danyades després de la isquèmia cerebral i que té un paper en la mort cel·lular. La inhibició d'AIF s'ha determinat que redueix la mort cel·lular (Culmsee et al., 2005). En el nostre model AIF s'allibera però no s'incrementa al nucli i això ens fa pensar que no juga un paper en la mortalitat. La seva expressió basal en el nucli de les cèl·lules SH-SY5Y pot fer-les més resistents a aquesta via de mort. Es creu que HSP70 pot retenir AIF (Garrido et al., 2006) i en ser constantment expressada en SH-SY5Y podria impedir que aquest incrementés al nucli. No obstant, no hem evaluat paràmetres característics d'activació de mort per AIF, com per exemple la fragmentació característica del DNA.

L'alliberació de factors proapoptòtics del mitocondri és comú en la reoxigenació independentment de la presència de glucosa, fet que ens fa pensar que l'estímul desencadenant és present durant la OGD, tot i que encara desconeixem quin és el fenomen activador. El citocrom c en sortir del mitocondri s'associa a Apaf i procaspasa9, per formar l'apoptosoma, que requereix ATP (Nicotera et al., 1998). D'aquesta manera s'activa caspasa 9 que alhora activa la caspasa 3, executora de la mort (Li and Yuan, 2008; Li et al., 1997; Zou et al., 1997). Només quan la reoxigenació és en presència de glucosa en el nostre model s'acaba executant l'activació d'apoptosi dependent de caspases, essent quelcom que depèn de l'estat cel·lular. L'ATP és rellevant en el condicionament de la mort cel·lular (Nicotera et al., 1997). S'ha implicat ATP en el canvi de tipus de mort cap a una mort apoptòtica (Izumov et al., 2004). S'ha vist que estímuls proapoptòtics que requereixen activació de caspases indueixen l'increment de nivells intracel·lulars d'ATP (Zamaraeva et al., 2005; Leist et al., 1997). L'aport de glucosa s'ha relacionat amb un canvi del tipus de mort de necròtica a apoptòtica dependent dels nivells d'ATP cel·lulars, assenyalant que són necessaris uns nivells apropiats d'ATP per activar l'apoptosi (Ueda et al., 2004). Donada la dependència de l'apoptosoma per ATP, la nostra hipòtesis és que tot i que l'alliberament de citocrom c és comú en els dos casos, només en la reoxigenació en presència de glucosa s'assoleixen nivells intracel·lulars d'ATP que permeten l'activació de caspases.

Les cèl·lules després de la isquèmia presenten molts mitocondris danyats. (Graham et al., 2001). La recuperació dels nivells d'ATP al llarg de la reoxigenació fa pensar que en cap dels tractaments tots els mitocondris estan danyats permanentment, ni han perdut totalment el citocrom c fet que els pogués fer no funcionals. De fet, s'ha vist que tot i que el citocrom c estigui difós el mitocondri pot funcionar (Waterhouse et al., 2001).

En el nostre model la viabilitat quasi no s'altera en acabar la OD tot i que semblen patir més estrès oxidatiu que en OGD (resultats no publicats). Donat que l'activitat de HIF1 en aquesta condició és molt elevada i que HIF1 sembla ser protector de l'estrès oxidatiu (Guo et al., 2009) aquest fet podria explicar la supervivència present en aquesta condició.

HIF1 α s'incrementa després de MCAO i la supressió de HIF1 α ja sigui per l'ús d'inhibidors com l'ús de siRNA HIF1 α sembla que redueixen el dany, disminueixen el volum d'infart, milloren dèficits neuronals, i atenuen l'hemorràgia en rates (Chen et al., 2009; Chen et al., publicat *online*). Sembla que la inhibició de HIF1 amplia el percentatge de mort general tant en la OD com la OGD en SHSY5Y (Guo et al., 2009). En estudiar les dues fases en el nostre model hem vist també un comportament diferencial de HIF1. La presència de glucosa en l'anòxia incrementa l'expressió de la subunitat HIF1 α i l'activitat del factor. Pensem que es tracta d'un fenomen de reforç positiu, ja que els gens incrementats són majoritàriament d'adaptació metabòlica basada en incrementar la glicòlisi; aquesta no és eficient si falta glucosa però sí s'incrementarà en presència de glucosa. La dependència de HIF per la glucosa és corroborada per altres (Vondermark et al., 2005), que argumenten que la falta de glucosa podria induir a la falta d'expressió de HIF1 en tumors hipòxics.

Donada la correlació entre l'expressió de la subunitat HIF1 α i l'activitat del factor ens hem centrat a estudiar modificacions de la proteïna que alteren la seva estabilitat (PHD) i hem descartat aquelles que no alteren l'expressió però sí la interacció amb l'heterodímer, o DNA o cosubstrats, com és el cas de la hidroxilasa FIH. No obstant, ens sembla detectar un canvi en el tamany aparent de la proteïna analitzada per Western Blot entre OD i OGD on no hem centrat l'estudi però que pensem que podria ser fosforil·lació ja que està descrita aquesta modificació en HIF1 α (Wei and Yu, 2007), però caldria un estudi més exhaustiu per validar aquesta hipòtesis.

HIF1 α es degrada ràpidament en la reoxigenació en el nostre model després de la OD pel sistema de degradació clàssic dependent d'oxigen. Un fet sorprenent és el manteniment de l'expressió de HIF1 α en la reoxigenació posterior a la OGD. En relació a aquest fenomen no hem vist diferències entre la presència o no de glucosa, (resultats no publicats) i per tant només hem determinat la reoxigenació sense glucosa per facilitar l'estudi.

PHD2 és la principal PHD que regula l'expressió de HIF1 α en normòxia (Berra et al., 2003). En el nostre estudi no existeixen diferències en l'expressió de la proteïna. Les PHDs van ser inicialment conegudes com a sensors d'oxigen però recentment s'han determinat també com a sensors metabòlics cel·lulars, donada la complexitat de la seva reacció. S'ha descrit la necessitat d'alfacetoglutarat com a cosubstrat de la reacció i estudis de patologies canceroses han determinat succinat i fumarat com a inhibidors de la reacció (Koivunen et al., 2007; Dalgard et al., 2004), el primer per inhibició per producte i el segon per semblança estructural al succinat, essent fins i tot un inhibidor més potent. Els nostres resultats suggereixen que un desequilibri entre les concentracions de cosubstrat i inhibidors poden alterar l'activitat PHD i disminuir la hidroxilació i degradació de HIF1 α .

En conclusió, en el nostre model la OD permet una adaptació metabòlica a les condicions ambientals mitjançant l'activació de HIF1 i els seus gens diana, que es veu reforçada per la presència de glucosa obtenint així una baixada menor dels nivells d'ATP i una major viabilitat en acabar la fase d'hipòxia. En la OGD la resposta a hipòxia és present però menor, ja que la manca de glucosa no la reforça i condueix a alteracions metabòliques que impediran la hidroxilació i degradació de HIF1 α en la reoxigenació. La baixada dràstica dels nivells d'ATP, que s'incrementen en la reoxigenació més ràpidament en presència de glucosa, sembla que poden permetre l'activació de vies de mort dependents de caspasa.

CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS

1. La línia cel·lular derivada de neuroblastoma humà SH-SY5Y diferenciada amb àcid retinoic és sensible a la isquèmia *in vitro* i respon amb l'activació del factor de resposta a hipòxia i amb la inducció de mort en la reoxigenació.
2. La mort cel·lular després de la hipòxia és majoritàriament necròtica, però durant la reoxigenació la proporció de mort apoptòtica depenent de caspases incrementa.
3. La glucosa juga un paper protector durant l'anòxia (OD), però tant en la línia cel·lular com en cultius primaris de neurones de rata la glucosa en reoxigenació posterior a la privació d'oxigen i glucosa (OGD) indueix mort apoptòtica per activació de caspases.
4. La presència de glucosa en la reoxigenació facilita la recuperació dels nivells d'ATP, fet que s'associa amb l'activació de caspases.
5. La presència de glucosa durant l'anòxia afavoreix una major expressió de HIF1 α i corresponent activitat del factor HIF1.
6. Mentre en la reoxigenació posterior a OD HIF1 α és degradat, l'alteració dels nivells de metabòlits del cicle de Krebs (fumarat, alfaetoglutarat) induïda pel període d'OGD altera la hidroxilació de HIF1 α i per tant promou la seva estabilització en condicions de normòxia .

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

Abu-Raya, S., Blaugrund, E., Trembovler, V., Schilderman-Bloch, E., Shohami, E., and Lazarovici, P. (1999). Rasagiline, a monoamine oxidase-B inhibitor, protects NGF-differentiated PC12 cells against oxygen-glucose deprivation. *J Neurosci Res* 58, 456-463.

Alvarez-Sabin, J., Molina, C.A., Montaner, J., Arenillas, J.F., Huertas, R., Ribo, M., Codina, A., and Quintana, M. (2003). Effects of admission hyperglycemia on stroke outcome in reperfused tissue plasminogen activator--treated patients. *Stroke* 34, 1235-1241.

Appelhoff, R.J., Tian, Y.M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Gleadle, J.M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 279, 38458-38465.

Aprelikova, O., Chandramouli, G.V., Wood, M., Vasselli, J.R., Riss, J., Maranchie, J.K., Linehan, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem* 92, 491-501.

Aragones, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M., Dirkx, R., Zacchigna, S., Lemieux, H., Jeoung, N.H., et al. (2008). Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* 40, 170-180.

Axelsson, V., Holback, S., Sjogren, M., Gustafsson, H., and Forsby, A. (2006). Gliotoxin induces caspase-dependent neurite degeneration and calpain-mediated general cytotoxicity in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1068-1074.

Barth, S., Nesper, J., Hasgall, P.A., Wirthner, R., Nytko, K.J., Edlich, F., Katschinski, D.M., Stiehl, D.P., Wenger, R.H., and Camenisch, G. (2007). The peptidyl prolyl cis/trans isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability. *Mol Cell Biol* 27, 3758-3768.

Bartrons, R., and Caro, J. (2007). Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr* 39, 223-229.

Baysal, B.E., Ferrell, R.E., Willett-Brozick, J.E., Lawrence, E.C., Myssiorek, D., Bosch, A., van der Mey, A., Taschner, P.E., Rubinstein, W.S., Myers, E.N., et al. (2000). Mutations in *SDHD*, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287, 848-851.

Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., and Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 22, 4082-4090.

Bishop, T., Gallagher, D., Pascual, A., Lygate, C.A., de Bono, J.P., Nicholls, L.G., Ortega-Saenz, P., Oster, H., Wijeyekoon, B., Sutherland, A.I., et al. (2008). Abnormal

- sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 28, 3386-3400.
- Boulahebel, H., Duran, R.V., and Gottlieb, E. (2009). Prolyl hydroxylases as regulators of cell metabolism. *Biochem Soc Trans* 37, 291-294.
- Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2009). HIF at a glance. *J Cell Sci* 122, 1055-1057.
- Bratslavsky, G., Sudarshan, S., Neckers, L., and Linehan, W.M. (2007). Pseudohypoxic pathways in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 4667-4671.
- Brodeur, G.M., Green, A.A., Hayes, F.A., Williams, K.J., Williams, D.L., and Tsiatis, A.A. (1981). Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res* 41, 4678-4686.
- Broughton, B.R., Reutens, D.C., and Sobey, C.G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40, e331-339.
- Bruick, R.K., and McKnight, S.L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-1340.
- Buchberger, A. (2002). From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends Cell Biol* 12, 216-221.
- Cao, G., Xing, J., Xiao, X., Liou, A.K., Gao, Y., Yin, X.M., Clark, R.S., Graham, S.H., and Chen, J. (2007). Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J Neurosci* 27, 9278-9293.
- Capes, S.E., Hunt, D., Malmberg, K., Pathak, P., and Gerstein, H.C. (2001). Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke* 32, 2426-2432.
- Carafoli, E., and Molinari, M. (1998). Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun* 247, 193-203.
- Carpentier, A., Balitrand, N., Rochette-Egly, C., Shroot, B., Degos, L., and Chomienne, C. (1997). Distinct sensitivity of neuroblastoma cells for retinoid receptor agonists: evidence for functional receptor heterodimers. *Oncogene* 15, 1805-1813.
- Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Maxwell, P.H. (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275, 25733-25741.
- Combs, D.J., Dempsey, R.J., Maley, M., Donaldson, D., and Smith, C. (1990). Relationship between plasma glucose, brain lactate, and intracellular pH during cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* 21, 936-942.

- Cook, J.C., and Chock, P.B. (1992). Isoforms of mammalian ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 267, 24315-24321.
- Crews, C.M. (2003). Feeding the machine: mechanisms of proteasome-catalyzed degradation of ubiquitinated proteins. *Curr Opin Chem Biol* 7, 534-539.
- Cronberg, T., Rytter, A., Asztely, F., Soder, A., and Wieloch, T. (2004). Glucose but not lactate in combination with acidosis aggravates ischemic neuronal death in vitro. *Stroke* 35, 753-757.
- Crumrine, R.C., Thomas, A.L., and Morgan, P.F. (1994). Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 14, 887-891.
- Culmsee, C., Zhu, C., Landshamer, S., Becattini, B., Wagner, E., Pellecchia, M., Blomgren, K., and Plesnila, N. (2005). Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 25, 10262-10272.
- Chachami, G., Paraskeva, E., Mingot, J.M., Braliou, G.G., Gorlich, D., and Simos, G. (2009). Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 235-240.
- Chen, C., Ostrowski, R.P., Zhou, C., Tang, J., and Zhang, J.H. Suppression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its downstream genes reduces acute hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation in a rat model of cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* (Published Online: 12 Feb 2010)
- Chen, C., Hu, Q., Yan, J., Yang, X., Shi, X., Lei, J., Chen, L., Huang, H., Han, J., Zhang, J.H., et al. (2009). Early inhibition of HIF-1alpha with small interfering RNA reduces ischemic-reperfused brain injury in rats. *Neurobiol Dis* 33, 509-517.
- Chen, Z.F., Schottler, F., and Lee, K.S. (1997). Neuronal recovery after moderate hypoxia is improved by the calpain inhibitor MDL28170. *Brain Res* 769, 188-192.
- Cheng, J., Kang, X., Zhang, S., and Yeh, E.T. (2007). SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* 131, 584-595.
- Cheung, Y.T., Lau, W.K., Yu, M.S., Lai, C.S., Yeung, S.C., So, K.F., and Chang, R.C. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 30, 127-135.
- 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-1alpha. *J Cell Sci* 112 (Pt 8), 1203-1212.
- Chopp, M., Welch, K.M., Tidwell, C.D., and Helpert, J.A. (1988). Global cerebral ischemia and intracellular pH during hyperglycemia and hypoglycemia in cats. *Stroke* 19, 1383-1387.

Chowdhury, R., McDonough, M.A., Mecinovic, J., Loenarz, C., Flashman, E., Hewitson, K.S., Domene, C., and Schofield, C.J. (2009). Structural basis for binding of hypoxia-inducible factor to the oxygen-sensing prolyl hydroxylases. *Structure* 17, 981-989.

Dalgard, C.L., Lu, H., Mohyeldin, A., and Verma, A. (2004). Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors. *Biochem J* 380, 419-424.

Dantuma, N.P., Lindsten, K., Glas, R., Jellne, M., and Masucci, M.G. (2000). Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nat Biotechnol* 18, 538-543.

Dayan, F., Roux, D., Brahimi-Horn, M.C., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2006). The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res* 66, 3688-3698.

de Groot, H., and Rauen, U. (2007). Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc* 39, 481-484.

Depping, R., Steinhoff, A., Schindler, S.G., Friedrich, B., Fagerlund, R., Metzen, E., Hartmann, E., and Kohler, M. (2008). Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta* 1783, 394-404.

Durand, R.E., and Raleigh, J.A. (1998). Identification of nonproliferating but viable hypoxic tumor cells in vivo. *Cancer Res* 58, 3547-3550.

Ehrismann, D., Flashman, E., Genn, D.N., Mathioudakis, N., Hewitson, K.S., Ratcliffe, P.J., and Schofield, C.J. (2007). Studies on the activity of the hypoxia-inducible-factor hydroxylases using an oxygen consumption assay. *Biochem J* 401, 227-234.

Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.

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 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4273-4278.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Endo, H., Kamada, H., Nito, C., Nishi, T., and Chan, P.H. (2006). Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J Neurosci* 26, 7974-7983.

Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., et al. (2001). *C. elegans* EGL-9 and

mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43-54.

Fandrey, J., Gorr, T.A., and Gassmann, M. (2006). Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res* 71, 642-651.

Ferrer, I., Friguls, B., Dalfo, E., Justicia, C., and Planas, A.M. (2003). Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29, 472-481

Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* 78, 477-513.

Folbergrova, J., Memezawa, H., Smith, M.L., and Siesjo, B.K. (1992). Focal and perifocal changes in tissue energy state during middle cerebral artery occlusion in normo- and hyperglycemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 12, 25-33.

Fong, C.T., Dracopoli, N.C., White, P.S., Merrill, P.T., Griffith, R.C., Housman, D.E., and Brodeur, G.M. (1989). Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3753-3757.

Fordel, E., Thijs, L., Martinet, W., Lenjou, M., Laufs, T., Van Bockstaele, D., Moens, L., and Dewilde, S. (2006). Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress-induced cell death. *Neurosci Lett* 410, 146-151.

Fordel, E., Thijs, L., Martinet, W., Schrijvers, D., Moens, L., and Dewilde, S. (2007). Anoxia or oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells: a step closer to the unraveling of neuroglobin and cytoglobin functions. *Gene* 398, 114-122.

Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604-4613.

Fujita, R., and Ueda, H. (2003a). Protein kinase C-mediated cell death mode switch induced by high glucose. *Cell Death Differ* 10, 1336-1347.

Fujita, R., and Ueda, H. (2003b). Protein kinase C-mediated necrosis-apoptosis switch of cortical neurons by conditioned medium factors secreted under the serum-free stress. *Cell Death Differ* 10, 782-790.

Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., and Kroemer, G. (2006). Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 5, 2592-2601.

Gerald, D., Berra, E., Frapart, Y.M., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Mansuy, D., Pouyssegur, J., Yaniv, M., and Mechta-Grigoriou, F. (2004). JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* 118, 781-794.

Gerber, H.P., Condorelli, F., Park, J., and Ferrara, N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 272, 23659-23667.

Gestblom, C., Grynfeld, A., Ora, I., Ortoft, E., Larsson, C., Axelson, H., Sandstedt, B., Cserjesi, P., Olson, E.N., and Pahlman, S. (1999). The basic helix-loop-helix transcription factor dHAND, a marker gene for the developing human sympathetic nervous system, is expressed in both high- and low-stage neuroblastomas. *Lab Invest* 79, 67-79.

Gilbert, F., Feder, M., Balaban, G., Brangman, D., Lurie, D.K., Podolsky, R., Rinaldt, V., Vinikoor, N., and Weisband, J. (1984). Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res* 44, 5444-5449.

Ginouves, A., Ilc, K., Macias, N., Pouyssegur, J., and Berra, E. (2008). PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIF α and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4745-4750.

Ginsberg, M.D. (1990). Local metabolic responses to cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 2, 58-93.

Gordan, J.D., and Simon, M.C. (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 17, 71-77.

Gorina, R., Petegnief, V., Chamorro, A., and Planas, A.M. (2005). AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway. *J Neurochem* 92, 505-518.

Graham, S.H., and Chen, J. (2001). Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 99-109.

Grynfeld, A., Pahlman, S., and Axelson, H. (2000). Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1. *Int J Cancer* 88, 401-410.

Guo, S., Miyake, M., Liu, K.J., and Shi, H. (2009). Specific inhibition of hypoxia inducible factor 1 exaggerates cell injury induced by in vitro ischemia through deteriorating cellular redox environment. *J Neurochem* 108, 1309-1321.

Habelhah, H., Laine, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Gershwin, M.E., Bowtell, D.D., and Ronai, Z. (2004). Regulation of 2-oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase stability by the RING finger ubiquitin ligase Siah. *J Biol Chem* 279, 53782-53788.

Hagen, T., Taylor, C.T., Lam, F., and Moncada, S. (2003). Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1 α . *Science* 302, 1975-1978.

Hammerling, U., Bjelfman, C., and Pahlman, S. (1987). Different regulation of N- and c-myc expression during phorbol ester-induced maturation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Oncogene* 2, 73-77.

- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hertz, L. (2008). Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology* 55, 289-309.
- Hewitson, K.S., Lienard, B.M., McDonough, M.A., Clifton, I.J., Butler, D., Soares, A.S., Oldham, N.J., McNeill, L.A., and Schofield, C.J. (2007). Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *J Biol Chem* 282, 3293-3301.
- Hirsila, M., Koivunen, P., Gunzler, V., Kivirikko, K.I., and Myllyharju, J. (2003). Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 278, 30772-30780.
- Holmquist, L., Jogi, A., and Pahlman, S. (2005). Phenotypic persistence after reoxygenation of hypoxic neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 116, 218-225.
- Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Lofstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, A., Gradin, K., et al. (2006). Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 10, 413-423.
- Hon, W.C., Wilson, M.I., Harlos, K., Claridge, T.D., Schofield, C.J., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J., Stuart, D.I., and Jones, E.Y. (2002). Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* 417, 975-978.
- Horvitz, H.R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59, 1701s-1706s.
- Hu, L.F., Wang, S., Shi, X.R., Yao, H.H., Sun, Y.H., Ding, J.H., Liu, S.Y., and Hu, G. (2005). ATP-sensitive potassium channel opener iptakalim protected against the cytotoxicity of MPP+ on SH-SY5Y cells by decreasing extracellular glutamate level. *J Neurochem* 94, 1570-1579.
- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S.M., and Lee, F.S. (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 277, 39792-39800.
- Huang, 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.
- Hussein, D., Estlin, E.J., Dive, C., and Makin, G.W. (2006). Chronic hypoxia promotes hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent resistance to etoposide and vincristine in neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 5, 2241-2250.
- Iijima, T. (2006). Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neurosci Res* 55, 234-243.

Iijima, T., Mishima, T., Tohyama, M., Akagawa, K., and Iwao, Y. (2003). Mitochondrial membrane potential and intracellular ATP content after transient experimental ischemia in the cultured hippocampal neuron. *Neurochem Int* 43, 263-269.

Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Mole, D.R., Lee, S., Torres-Cabala, C., Chung, Y.L., Merino, M., Trepel, J., Zbar, B., Toro, J., et al. (2005). HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 8, 143-153.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-468.

Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Klausner, R.D., and Pause, A. (1999). Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12436-12441.

Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., et al. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 12, 149-162.

Izyumov, D.S., Avetisyan, A.V., Pletjushkina, O.Y., Sakharov, D.V., Wirtz, K.W., Chernyak, B.V., and Skulachev, V.P. (2004). "Wages of fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1658, 141-147.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., et al. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.

Jalava, A., Akerman, K., and Heikkila, J. (1993). Protein kinase inhibitor, staurosporine, induces a mature neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells through an α -, β -, and ζ -protein kinase C-independent pathway. *J Cell Physiol* 155, 301-312.

Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R.H., and Gassmann, M. (2001). Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 15, 1312-1314.

Jogi, A., Ora, I., Nilsson, H., Lindeheim, A., Makino, Y., Poellinger, L., Axelson, H., and Pahlman, S. (2002). Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7021-7026.

Jogi, A., Vallon-Christersson, J., Holmquist, L., Axelson, H., Borg, A., and Pahlman, S. (2004). Human neuroblastoma cells exposed to hypoxia: induction of genes associated with growth, survival, and aggressive behavior. *Exp Cell Res* 295, 469-487.

Jonas, E.A. (2009). Molecular participants in mitochondrial cell death channel formation during neuronal ischemia. *Exp Neurol* 218, 203-212.

Joshi, S., Guleria, R., Pan, J., DiPette, D., and Singh, U.S. (2006). Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene* 25, 240-247.

Joshi, S., Guleria, R.S., Pan, J., Dipette, D., and Singh, U.S. (2007). Heterogeneity in retinoic acid signaling in neuroblastomas: Role of matrix metalloproteinases in retinoic acid-induced differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1772, 1093-1102.

Joza, N., Pospisilik, J.A., Hangen, E., Hanada, T., Modjtahedi, N., Penninger, J.M., and Kroemer, G. (2009). AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann N Y Acad Sci* 1171, 2-11.

Kaelin, W.G., Jr. (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2, 673-682.

Kaelin, W.G., Jr., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 30, 393-402.

Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J* 17, 6573-6586.

Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274, 6519-6525.

Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2000). Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10430-10435.

Kang, Y., Vossler, R.A., Diaz-Martinez, L.A., Winter, N.S., Clarke, D.J., and Walters, K.J. (2006). UBL/UBA ubiquitin receptor proteins bind a common tetraubiquitin chain. *J Mol Biol* 356, 1027-1035.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Kim, J.E., Oh, J.H., Choi, W.S., Chang, H., Sohn, S., Krajewski, S., Reed, J.C., O'Malley, K.L., and Oh, Y.J. (1999). Sequential cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase and appearance of a small Bax-immunoreactive protein are blocked by Bcl-X(L) and caspase inhibitors during staurosporine-induced dopaminergic neuronal apoptosis. *J Neurochem* 72, 2456-2463.

Kim, J.W., Gao, P., Liu, Y.C., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol* 27, 7381-7393.

Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006a). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3, 177-185.

Kim, S.D., Moon, C.K., Eun, S.Y., Ryu, P.D., and Jo, S.A. (2005). Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 326-334.

Kim, S.G., Manes, N.P., El-Maghrabi, M.R., and Lee, Y.H. (2006b). Crystal structure of the hypoxia-inducible form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3): a possible new target for cancer therapy. *J Biol Chem* 281, 2939-2944.

King, A., Selak, M.A., and Gottlieb, E. (2006). Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* 25, 4675-4682.

Kivirikko, K.I., and Pihlajaniemi, T. (1998). Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 72, 325-398.

Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tsujimoto, Y., Ohtsuki, T., Kuwabara, K., Matsushita, K., Yang, G., Tanabe, H., Martinou, J.C., Hori, M., et al. (1998). Amelioration of hippocampal neuronal damage after global ischemia by neuronal overexpression of BCL-2 in transgenic mice. *Stroke* 29, 2616-2621.

Klein, J.A., Longo-Guess, C.M., Rossmann, M.P., Seburn, K.L., Hurd, R.E., Frankel, W.N., Bronson, R.T., and Ackerman, S.L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367-374.

Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.

Knowles, H.J., Raval, R.R., Harris, A.L., and Ratcliffe, P.J. (2003). Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res* 63, 1764-1768.

Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-644.

Koivunen, P., Hirsila, M., Remes, A.M., Hassinen, I.E., Kivirikko, K.I., and Myllyharju, J. (2007). Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem* 282, 4524-4532.

Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368-372.

Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14, 32-43.

- Kurihara, S., Hakuno, F., and Takahashi, S. (2000). Insulin-like growth factor-I-dependent signal transduction pathways leading to the induction of cell growth and differentiation of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: the roles of MAP kinase pathway and PI 3-kinase pathway. *Endocr J* 47, 739-751.
- Kusumoto, M., Dux, E., Paschen, W., and Hossmann, K.A. (1996). Susceptibility of hippocampal and cortical neurons to argon-mediated in vitro ischemia. *J Neurochem* 67, 1613-1621.
- 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.
- Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., and Corbett, A.H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 282, 5101-5105.
- Lankiewicz, S., Marc Luetjens, C., Truc Bui, N., Krohn, A.J., Poppe, M., Cole, G.M., Saido, T.C., and Prehn, J.H. (2000). Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 275, 17064-17071.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F.M., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., et al. (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260, 1317-1320.
- Lavenius, E., Parrow, V., Nanberg, E., and Pahlman, S. (1994). Basic FGF and IGF-I promote differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells in culture. *Growth Factors* 10, 29-39.
- Lavrik, I., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118, 265-267.
- Le, D.A., Wu, Y., Huang, Z., Matsushita, K., Plesnila, N., Augustinack, J.C., Hyman, B.T., Yuan, J., Kuida, K., Flavell, R.A., et al. (2002). Caspase activation and neuroprotection in caspase-3- deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15188-15193.
- Lee, D.H., and Goldberg, A.L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8, 397-403.
- Lee, J.W., Bae, S.H., Jeong, J.W., Kim, S.H., and Kim, K.W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36, 1-12.
- Lee, M.K., Kang, S.J., Poncz, M., Song, K.J., and Park, K.S. (2007). Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine. *Exp Mol Med* 39, 376-384.

- Lehman, N.L. (2009). The ubiquitin proteasome system in neuropathology. *Acta Neuropathol* 118, 329-347.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S., and Nicotera, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185, 1481-1486.
- Levy, N.S., Chung, S., Furneaux, H., and Levy, A.P. (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273, 6417-6423.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Li, J., and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194-6206.
- Li, K., Li, Y., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Spencer, E., Chen, Z.J., Wang, X., and Williams, R.S. (2000). Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* 101, 389-399.
- Liang, Y., Yan, C., Nylander, K.D., and Schor, N.F. (2003). Early events in Bcl-2-enhanced apoptosis. *Apoptosis* 8, 609-616.
- Lin, B., Busto, R., Globus, M.Y., Martinez, E., and Ginsberg, M.D. (1995). Brain temperature modulations during global ischemia fail to influence extracellular lactate levels in rats. *Stroke* 26, 1634-1638.
- Lin, B., Ginsberg, M.D., Busto, R., and Li, L. (2000). Hyperglycemia triggers massive neutrophil deposition in brain following transient ischemia in rats. *Neurosci Lett* 278, 1-4.
- Linnik, M.D., Zahos, P., Geschwind, M.D., and Federoff, H.J. (1995). Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia. *Stroke* 26, 1670-1674; discussion 1675.
- Lisztwan, J., Imbert, G., Wirbelauer, C., Gstaiger, M., and Krek, W. (1999). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev* 13, 1822-1833.
- Liu, K., Li, L., and Cohen, S.N. (2000). Antisense RNA-mediated deficiency of the calpain protease, nCL-4, in NIH3T3 cells is associated with neoplastic transformation and tumorigenesis. *J Biol Chem* 275, 31093-31098.
- Liu, W., and Linn, S. (2000). Proteolysis of the human DNA polymerase epsilon catalytic subunit by caspase-3 and calpain specifically during apoptosis. *Nucleic Acids Res* 28, 4180-4188.
- Liu, Y.V., and Semenza, G.L. (2007). RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. *Cell Cycle* 6, 656-659.

- Lopez, E., and Ferrer, I. (2000). Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 85, 61-67.
- Luo, J.C., and Shibuya, M. (2001). A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene* 20, 1435-1444.
- MacKenzie, E.D., Selak, M.A., Tennant, D.A., Payne, L.J., Crosby, S., Frederiksen, C.M., Watson, D.G., and Gottlieb, E. (2007). Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol* 27, 3282-3289.
- Mahon, P.C., Hirota, K., and Semenza, G.L. (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 15, 2675-2686.
- Mailloux, R.J., and Appanna, V.D. (2007). Aluminum toxicity triggers the nuclear translocation of HIF-1alpha and promotes anaerobiosis in hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 21, 16-24.
- Mailloux, R.J., Puiseux-Dao, S., and Appanna, V.D. (2009). Alpha-ketoglutarate abrogates the nuclear localization of HIF-1alpha in aluminum-exposed hepatocytes. *Biochimie* 91, 408-415.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., and Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative wregulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414, 550-554.
- Malagelada, C., Xifro, X., Minano, A., Sabria, J., and Rodriguez-Alvarez, J. (2005). Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiol Dis* 20, 27-37.
- Martin, A., Rojas, S., Chamorro, A., Falcon, C., Bargallo, N., and Planas, A.M. (2006). Why does acute hyperglycemia worsen the outcome of transient focal cerebral ischemia? Role of corticosteroids, inflammation, and protein O-glycosylation. *Stroke* 37, 1288-1295.
- Martini, S.R., and Kent, T.A. (2007). Hyperglycemia in acute ischemic stroke: a vascular perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 435-451.
- Mattson, M.P., Culmsee, C., and Yu, Z.F. (2000). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 301, 173-187.
- Maxwell, P.H. (2005). The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol* 16, 523-530.
- 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 tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.

McDonough, M.A., Li, V., Flashman, E., Chowdhury, R., Mohr, C., Lienard, B.M., Zondlo, J., Oldham, N.J., Clifton, I.J., Lewis, J., et al. (2006). Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9814-9819.

Messner, K.R., and Imlay, J.A. (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem* 277, 42563-42571.

Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J.H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W.Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W., et al. (2003a). Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116, 1319-1326.

Metzen, E., Zhou, J., Jelkmann, W., Fandrey, J., and Brune, B. (2003). Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* 14, 3470-3481.

Min, J.H., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin, W.G., Jr., and Pavletich, N.P. (2002). Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296, 1886-1889.

Minamishima, Y.A., Moslehi, J., Bardeesy, N., Cullen, D., Bronson, R.T., and Kaelin, W.G., Jr. (2008). Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood* 111, 3236-3244.

Minchenko, O., Opentanova, I., and Caro, J. (2003). Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett* 554, 264-270.

Minchenko, O.H., Ochiai, A., Opentanova, I.L., Ogura, T., Minchenko, D.O., Caro, J., Komisarenko, S.V., and Esumi, H. (2005). Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie* 87, 1005-1010.

Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwieg, E.A., and Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75, 653-660.

Moubarak, R.S., Yuste, V.J., Artus, C., Bouharrou, A., Greer, P.A., Menissier-de Murcia, J., and Susin, S.A. (2007). Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol* 27, 4844-4862.

Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S., and Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 281, 33095-33106.

Nakayama, K., Frew, I.J., Hagensen, M., Skals, M., Habelhah, H., Bhoumik, A., Kadoya, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Frappell, P.B., et al. (2004). Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 117, 941-952.

Nath, R., Probert, A., Jr., McGinnis, K.M., and Wang, K.K. (1998). Evidence for activation of caspase-3-like protease in excitotoxin- and hypoxia/hypoglycemia-injured neurons. *J Neurochem* 71, 186-195.

Nath, R., Raser, K.J., McGinnis, K., Nadimpalli, R., Stafford, D., and Wang, K.K. (1996). Effects of ICE-like protease and calpain inhibitors on neuronal apoptosis. *Neuroreport* 8, 249-255.

Nicotera, P., and Leist, M. (1997). Energy supply and the shape of death in neurons and lymphoid cells. *Cell Death Differ* 4, 435-442.

Nilsson, H., Jogi, A., Beckman, S., Harris, A.L., Poellinger, L., and Pahlman, S. (2005). HIF-2alpha expression in human fetal paraganglia and neuroblastoma: relation to sympathetic differentiation, glucose deficiency, and hypoxia. *Exp Cell Res* 303, 447-456.

Obach, M., Navarro-Sabate, A., Caro, J., Kong, X., Duran, J., Gomez, M., Perales, J.C., Ventura, F., Rosa, J.L., and Bartrons, R. (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem* 279, 53562-53570.

Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V., and Kaelin, W.G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2, 423-427.

Ohno, H., Uemura, K., Shintani-Ishida, K., Nakamura, M., Inomata, M., and Yoshida, K. (2007). Ischemia promotes calpain-mediated degradation of p120-catenin in SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 547-552.

Orellana, J.A., Hernandez, D.E., Ezan, P., Velarde, V., Bennett, M.V., Giaume, C., and Saez, J.C. (2010). Hypoxia in high glucose followed by reoxygenation in normal glucose reduces the viability of cortical astrocytes through increased permeability of connexin 43 hemichannels. *Glia* 58, 329-343.

Ow, Y.P., Green, D.R., Hao, Z., and Mak, T.W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 532-542.

Ozer, A., Wu, L.C., and Bruick, R.K. (2005). The candidate tumor suppressor ING4 represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7481-7486.

Pahlman, S., Hoehner, J.C., Nanberg, E., Hedborg, F., Fagerstrom, S., Gestblom, C., Johansson, I., Larsson, U., Lavenius, E., Ortoft, E., et al. (1995). Differentiation and

survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer* 31A, 453-458.

Pahlman, S., Mamaeva, S., Meyerson, G., Mattsson, M.E., Bjelfman, C., Ortoft, E., and Hammerling, U. (1990). Human neuroblastoma cells in culture: a model for neuronal cell differentiation and function. *Acta Physiol Scand Suppl* 592, 25-37.

Pahlman, S., Odelstad, L., Larsson, E., Grotte, G., and Nilsson, K. (1981). Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Int J Cancer* 28, 583-589.

Pahlman, S., Ruusala, A.I., Abrahamsson, L., Mattsson, M.E., and Esscher, T. (1984). Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation. *Cell Differ* 14, 135-144.

Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3, 187-197.

Payne, R.S., Tseng, M.T., and Schurr, A. (2003). The glucose paradox of cerebral ischemia: evidence for corticosterone involvement. *Brain Res* 971, 9-17.

Peet, D., and Linke, S. (2006). Regulation of HIF: asparaginyl hydroxylation. *Novartis Found Symp* 272, 37-49; discussion 49-53, 131-140.

Petegnief, V., Saura, J., de Gregorio-Rocasolano, N., and Paul, S.M. (2001). Neuronal injury-induced expression and release of apolipoprotein E in mixed neuron/glia co-cultures: nuclear factor kappaB inhibitors reduce basal and lesion-induced secretion of apolipoprotein E. *Neuroscience* 104, 223-234.

Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A.S., Schuepbach, R.A., Rankin, E., Vaulont, S., Haase, V.H., Nizet, V., and Johnson, R.S. (2007). Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest* 117, 1926-1932.

Polster, B.M., Basanez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J.M., and Nicholls, D.G. (2005). Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* 280, 6447-6454.

Porter, A.G., and Janicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 99-104.

Posmantur, R., McGinnis, K., Nadimpalli, R., Gilbertsen, R.B., and Wang, K.K. (1997). Characterization of CPP32-like protease activity following apoptotic challenge in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* 68, 2328-2337.

Prabhakaran, K., Sampson, D.A., and Hoehner, J.C. (2004). Neuroblastoma survival and death: an in vitro model of hypoxia and metabolic stress. *J Surg Res* 116, 288-296.

- Pugh, C.W., Tan, C.C., Jones, R.W., and Ratcliffe, P.J. (1991). Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10553-10557.
- Ratcliffe, P.J. (2007). HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest* 117, 862-865.
- Reynolds, C.P., and Lemons, R.S. (2001). Retinoid therapy of childhood cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 15, 867-910.
- Reynolds, C.P., Matthay, K.K., Villablanca, J.G., and Maurer, B.J. (2003). Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 197, 185-192.
- Ribes, A., Riudor, E., Briones, P., Christensen, E., Campistol, J., and Millington, D.S. (1992). Significance of bound glutarate in the diagnosis of glutaric aciduria type I. *J Inher Metab Dis* 15, 367-370.
- Riccardi, C., and Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1, 1458-1461.
- Riedl, S.J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
- Ronca, F., Yee, K.S., and Yu, V.C. (1999). Retinoic acid confers resistance to p53-dependent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells by modulating nuclear import of p53. *J Biol Chem* 274, 18128-18134.
- Ross, R.A., Biedler, J.L., and Spengler, B.A. (2003). A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett* 197, 35-39.
- Ryan, H.E., Lo, J., and Johnson, R.S. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 17, 3005-3015.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
- Sakurada, K., Kitanaka, C., Kokubu, A., Tomiyama, A., Sunayama, J., Kayama, T., and Kuchino, Y. (2002). A cellular mechanism that reversibly inactivates pancaspase inhibitor zAsp-CH(2)-DCB: a potential pitfall causing discrepancy between in vitro and in vivo caspase assays. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 1022-1030.
- Sanchez-Chavez, J.J. (1999). [The penumbra area]. *Rev Neurol* 28, 810-816.
- Sanchez-Puig, N., Veprintsev, D.B., and Fersht, A.R. (2005). Binding of natively unfolded HIF-1alpha ODD domain to p53. *Mol Cell* 17, 11-21.
- Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 343-354.

Schurr, A. (2002). Bench-to-bedside review: a possible resolution of the glucose paradox of cerebral ischemia. *Crit Care* 6, 330-334.

Schurr, A., Payne, R.S., Miller, J.J., and Tseng, M.T. (2001). Preischemic hyperglycemia-aggravated damage: evidence that lactate utilization is beneficial and glucose-induced corticosterone release is detrimental. *J Neurosci Res* 66, 782-789.

Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., and Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7, 77-85.

Selak, M.A., Duran, R.V., and Gottlieb, E. (2006). Redox stress is not essential for the pseudo-hypoxic phenotype of succinate dehydrogenase deficient cells. *Biochim Biophys Acta* 1757, 567-572.

Semenza, G.L. (1999). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 551-578.

Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.
Shen, J.H., Zhang, Y., Wu, N.H., and Shen, Y.F. (2007). Resistance to geldanamycin-induced apoptosis in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 414, 110-114.

Semenza, G.L. (2007). HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J Bioenerg Biomembr* 39, 231-234.

Semenza, G.L., Neufelt, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5680-5684.

Shen, J.H., Zhang, Y., Wu, N.H., and Shen, Y.F. (2007). Resistance to geldanamycin-induced apoptosis in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 414, 110-114.

Shimoda, L.A., Fallon, M., Pisarcik, S., Wang, J., and Semenza, G.L. (2006). HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L941-949.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-845

Sidell, N. (1982). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 68, 589-596.

Sidell, N., Altman, A., Haussler, M.R., and Seeger, R.C. (1983). Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 148, 21-30.

Siesjo, B.K. (1990). Calcium in the brain under physiological and pathological conditions. *Eur Neurol* 30 Suppl 2, 3-9; discussion 39-41.

Simon, M.C., and Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 285-296.

Simon, M.P., Tournaire, R., and Pouyssegur, J. (2008). The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J Cell Physiol* 217, 809-818.

Stebbins, C.E., Kaelin, W.G., Jr., and Pavletich, N.P. (1999). Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 284, 455-461.

Steinhoff, A., Pientka, F.K., Mockel, S., Kettelhake, A., Hartmann, E., Kohler, M., and Depping, R. (2009). Cellular oxygen sensing: Importins and exportins are mediators of intracellular localisation of prolyl-4-hydroxylases PHD1 and PHD2. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 705-711.

Stroka, D.M., Burkhardt, T., Desbaillets, I., Wenger, R.H., Neil, D.A., Bauer, C., Gassmann, M., and Candinas, D. (2001). HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 15, 2445-2453.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Symon, L. (1993). Recovery of brain function following ischemia. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 57, 102-109.

Tabakman, R., Jiang, H., Shahar, I., Arien-Zakay, H., Levine, R.A., and Lazarovici, P. (2005). Neuroprotection by NGF in the PC12 in vitro OGD model: involvement of mitogen-activated protein kinases and gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 1053, 84-96.

Takahashi, T., Deng, Y., Maruyama, W., Dostert, P., Kawai, M., and Naoi, M. (1994). Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm Gen Sect* 98, 107-118.

Tanaka, K., West-Dull, A., Hine, D.G., Lynn, T.B., and Lowe, T. (1980). Gas-chromatographic method of analysis for urinary organic acids. II. Description of the procedure, and its application to diagnosis of patients with organic acidurias. *Clin Chem* 26, 1847-1853.

Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Ueda, H., and Fujita, R. (2004). Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. *Biol Pharm Bull* 27, 950-955.

Um, M., and Lodish, H.F. (2006). Antiapoptotic effects of erythropoietin in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells require activation of both the STAT5 and AKT signaling pathways. *J Biol Chem* 281, 5648-5656.

Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T., and Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91, 627-637.

Valencia, A., and Moran, J. (2004). Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic Biol Med* 36, 1112-1125.

von Coelln, R., Kugler, S., Bahr, M., Weller, M., Dichgans, J., and Schulz, J.B. (2001). Rescue from death but not from functional impairment: caspase inhibition protects dopaminergic cells against 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not against the loss of their terminals. *J Neurochem* 77, 263-273.

Vordermark, D., Kraft, P., Katzer, A., Bolling, T., Willner, J., and Flentje, M. (2005). Glucose requirement for hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Cancer Lett* 230, 122-133.

Vordermark, D., and Brown, J.M. (2003). Evaluation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) as an intrinsic marker of tumor hypoxia in U87 MG human glioblastoma: in vitro and xenograft studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56, 1184-1193.

Wallace, D.C. (2005). Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, 363-374.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514.

Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270, 1230-1237.

Wang, H., Yu, S.W., Koh, D.W., Lew, J., Coombs, C., Bowers, W., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2004). Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* 24, 10963-10973.

Wang, K.K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23, 20-26.

Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., and Xue, D. (2002). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298, 1587-1592.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.

Waterhouse, N.J., Goldstein, J.C., von Ahsen, O., Schuler, M., Newmeyer, D.D., and Green, D.R. (2001). Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and

ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol* 153, 319-328.

Webb, J.D., Coleman, M.L., and Pugh, C.W. (2009). Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cell Mol Life Sci* 66, 3539-3554.

Wei, W., and Yu, X.D. (2007). Hypoxia-inducible factors: crosstalk between their protein stability and protein degradation. *Cancer Lett* 257, 145-156.

Weidemann, A., and Johnson, R.S. (2008). Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* 15, 621-627.

Wenger, R.H., Kvietikova, I., Rolfs, A., Gassmann, M., and Marti, H.H. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 alpha is regulated at the post-mRNA level. *Kidney Int* 51, 560-563.

Wenger, R.H., Stiehl, D.P., and Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005, re12.

Wenker, S.D., Chamorro, M.E., Vota, D.M., Callero, M.A., Vittori, D.C., and Nesse, A.B. (2010). Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells. *J Cell Biochem*.

Willies, G.H., and Woolf, C.J. (1980). The site of action of corticosteroid antipyresis in the rabbit. *J Physiol* 300, 1-6.

Willam, C., Maxwell, P.H., Nichols, L., Lygate, C., Tian, Y.M., Bernhardt, W., Wiesener, M., Ratcliffe, P.J., Eckardt, K.U., and Pugh, C.W. (2006). HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* 41, 68-77.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.

Yang, W., Sheng, H., Homi, H.M., Warner, D.S., and Paschen, W. (2008). Cerebral ischemia/stroke and small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation--a new target for therapeutic intervention? *J Neurochem* 106, 989-999.

Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Leger, C., Byrne, B., Cecchini, G., and Iwata, S. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299, 700-704.

Ying, W., Chen, Y., Alano, C.C., and Swanson, R.A. (2002). Tricarboxylic acid cycle substrates prevent PARP-mediated death of neurons and astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 774-779.

Young, R.M., Wang, S.J., Gordan, J.D., Ji, X., Liebhaber, S.A., and Simon, M.C. (2008). Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site-independent mechanism. *J Biol Chem* 283, 16309-16319.

Yu, S.W., Andrabi, S.A., Wang, H., Kim, N.S., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2006a). Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18314-18319.

Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-263.

Yu, T., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2006b). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2653-2658.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.

Zamaraeva, M.V., Sabirov, R.Z., Maeno, E., Ando-Akatsuka, Y., Bessonova, S.V., and Okada, Y. (2005). Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ* 12, 1390-1397.

Zhu, C., Wang, X., Huang, Z., Qiu, L., Xu, F., Vahsen, N., Nilsson, M., Eriksson, P.S., Hagberg, H., Culmsee, C., et al. (2007). Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* 14, 775-784.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

