



Interacción entre las vías HIF, Notch y SUMO y su implicación en la biología de las hMSCs

María Ciria Calduch

Septiembre 2018

Directora: Dra Pilar Sepúlveda Sanchis

Co-Directora: Dra Imelda Ontoria Oviedo

Tutor: Dr Ramón Serrano Salóm



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION



Instituto de
Investigación
Sanitaria La Fe

Interacción entre las vías HIF, Notch y SUMO y su implicación en la biología de las hMSCs

María Ciria Calduch
Septiembre 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a la Dra Pilar Sepúlveda y al Dr Jose Anastasio Montero por la oportunidad que me brindaron al confiar en mí, permitiéndome desarrollar mi tesis doctoral como miembro de su equipo en la unidad mixta de Regeneración y Trasplante Cardíaco IISLaFe-CIPF.

Quiero agradecer al ISCIII y a la Generalitat Valenciana por la financiación de los proyectos de investigación que he desarrollado durante mi estancia en el IISLaFe-CIPF y por su apoyo logístico.

Me gustaría dar las gracias especialmente a Pilar Sepúlveda por haberme dirigido en el desarrollo de este trabajo, por confiar plenamente en mí, por darme la libertad de poder experimentar todas aquellas ideas que me surgían, por permitirme hablar como estando en casa, en definitiva, por haber sido una jefa ejemplar.

Quiero agradecer a la Dra Imelda Ontoria su co-dirección de tesis. Gracias por tu esfuerzo, por tu experiencia, por formarme como científica y hacer que no me rinda, ¡gracias por todo y por la morcilla en sangre!

Me gustaría nombrar también al Dr Akaitz Dorronsoro, gracias por tus consejos y por tus “leches” que te abren los ojos en el momento oportuno. Mil esker, bihotzez.

Quiero dar las gracias a todos los compañeros que he tenido a lo largo de estos años y por su inestimable ayuda tanto a nivel profesional como personal. A Patricia Genovés, mi cuki del alma (que bien lo hemos pasado y cuanto te he echado de menos); a Hernán González-King, porque empezamos juntos en esto y a pesar de todo es mi ojito derecho!; al Dr Nahuel García, por enseñarnos a “rockandrollar” en la ciencia, por hacernos luchar por nuestros sueños y defender nuestros intereses, ah! y por dejarnos el póster de Papo para encomendarnos a él en los experimentos importantes. A la Dra Ana Sanchís por cuidarme en su estancia en el laboratorio como si fuese su protegida, a la Dra Ana Cervera por todos sus consejos moleculares, a Marina Piquer (sus gestiones y sus arsenales de comida jaja), a Rosa Vives (por todo ese trabajo que no se ve y que gracias a él tenemos con qué trabajar), a Delia Castellano (y las ratas y los infartos), a Rubén Carrero por su ayuda inestimable... a Sandra Tejedor, la piñita y su risita contagiosa, a mi mami del grupo: la Dra Amparo Hernández (¡me mimaba mucho y yo la quiero más!), a Rafa Sánchez, ¡porque no ha habido ni habrá otro como tú! No se puede ser más grande, más bueno, mejor compañero y bailar tan bien el baile del éxito, ¡¡jillo cabessa!! ¡¡A Marc Buigues y su halo!! y como no, a la niña de mis ojos, mi Marta Gómez, que no hay persona más buena y bonita sobre la faz de la tierra, por ser tan generosa tanto a nivel profesional como personal.

Espero no dejarme a nadie, pero es posible...si es así no me lo tengáis en cuenta que ya tengo la cabeza del revés.

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños. Gracias a ellos por confiar y creer en mis expectativas cada día. Gracias mamá por estar dispuesta a acompañarme en cada larga noche de estudio, por las noches en las que tu compañía hacía todo llevadero y por esos cafés que para mí eran como agua en el desierto. Gracias a mi padre por desear siempre lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo, por tu manera de ser y por cada una de tus palabras que me han guiado en mi vida. Gracias a los dos por estar presentes no solo en esta etapa tan importante de mi vida, sino en cada momento, ofreciéndome lo mejor para mi persona y gracias por todos vuestros sacrificios, nosotros sabemos que no han sido pocos.

La vida puede ser dura, pero el vivirla con éxito es un privilegio reservado para valientes, que con amor y pasión luchan, como mi abuelo Luis. Mi abuelo es un hombre luchador por su familia, justo, admirable, que entrega todo a los suyos, ese es mi abuelo: “el amo de la casa i del carrer, de la uva i de la parra i de la flor del taronger”. Durante el desarrollo y realización de esta tesis, él ha sido un pilar muy importante, tanto en inspiración como en fuerza para enfrentarme con ganas a nuevos retos, sueños y preocupaciones. Gracias por soñar tantas veces que encontraba un remedio muy pero que muy eficaz contra la calvicie jajajaja. Gracias a la vida por permitirme vivir y disfrutar al lado de mi abuelo, porque cada día me enseña algo nuevo, pero sobre todo gracias por enseñarme a disfrutar de cada detalle, gracias por creer en mí y gracias por quererme. Te quiero abuelo, que orgullosa estaría la abuela Pilar.

A lo largo de estos años me he dado cuenta de que hay cosas para las que soy un auténtico desastre (jamás coseré la ropa a no ser que quieras una sutura, ni me des una planta, ni si quiera un cactus. Créeme), pero me he dado cuenta de que hay muchas otras cosas para las que soy buena. He encontrado destrezas y habilidades que jamás pensé que se desarrollasen en mí, pero lo realmente importante es que he podido descubrir que por más que disfrute de trabajar, siempre obtendré un mejor resultado si el trabajo se realiza con ayuda y con la compañía perfecta, que dentro del desarrollo de esta tesis se presentaron muchos momentos en los cuales parecía que los deberes y compromisos fueran a acabar por completo con mi vida y mi existencia (así de melodramática soy), pero también he podido entender en ese justo momento de dificultad, que la ayuda idónea no llega cuanto la solicitas, en ese momento, pude entender que la ayuda idónea, siempre llega justo a tiempo.

Por esto mismo quiero dar las gracias también a mi pareja, a Javi, a esta persona que ha estado apoyándome en cada decisión tomada, a esa persona que ha tenido paciencia y entrega conmigo, a Javi le agradezco mucho, porque en parte, gracias a ti hoy puedo presentar y disfrutar esta tesis con alegría y con la emoción de saber que vamos a ser padres. Mágico tiempo que nacerá en abril.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	13
RESUMEN	18
SUMMARY	20
RESUM	22

1 INTRODUCCIÓN 24

1.1	Terapia Celular	26
1.2	Células madre	27
1.2.1	Clasificación de las células madre	29
1.2.1.1	Clasificación de las células madre en función de su origen	29
1.2.1.2	Clasificación de células madre en función de su potencialidad...	30
1.2.2	Células estromales mesenquimales (MSCs).....	31
1.2.2.1	Caracterización biológica	32
1.2.2.2	Fuentes de aislamiento de MSCs.....	35
1.2.2.3	Ensayos clínicos con MSCs.....	35
1.3	La hipoxia como inductora de respuesta de los sistemas biológicos.....	36
1.3.1	Respuesta a la hipoxia	37
1.3.2	HIF-1 y otros miembros de la superfamilia de HIF.....	39
1.3.3	Activación de la vía HIF-1	41
1.4	Vía de señalización Notch, componentes y activación.....	43
1.4.1	Activación de la vía de Notch	43
1.4.2	Receptores y ligandos de la vía de Notch.....	44
1.4.2.1	Receptores de la familia Notch.....	44
1.4.2.2	Ligandos de la vía Notch.....	46
1.4.3	Interacción receptor-ligando.....	48

1.5	La proteína SUMO (<i>Small-Ubiquitin related Modifier</i>) implicaciones biológicas y proceso de conjugación.....	49
1.5.1	Vía de conjugación de SUMO a proteínas diana.....	50
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
2.1	HIPÓTESIS	55
2.2	OBJETIVOS.....	56
3	MATERIAL Y MÉTODOS	58
3.1	Modelos celulares.....	60
3.1.1	Líneas celulares procariotas.....	60
3.1.1.1	Medios de cultivo procariota.....	60
3.1.2	Líneas celulares eucariotas.....	60
3.1.2.1	Medios de cultivo eucariota.....	61
3.2	Métodos de Genética Molecular.....	61
3.2.1	Transformación bacteriana y obtención del plásmido purificado.....	61
3.2.2	Extracción y purificación de ADN plasmídico.....	62
3.2.3	Inhibición química de la SUMOilación y detección de los sitios de unión de SUMO.....	62
3.2.4	Generación de mutantes de N1ICD.....	63
3.2.5	Digestiones enzimáticas.....	65
3.2.6	Transducción lentiviral.....	66
3.2.6.1	Transducción de MSCs con los vectores lentivirales.....	66
3.2.6.2	Infección de HEK 293T con los vectores lentivirales.....	68
3.3	Métodos de Biología Molecular.....	68
3.3.1	Extracción de ARN y cuantificación.....	68
3.3.2	Generación de ADN copia por retrotranscripción.....	69
3.3.3	Cuantificación relativa de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real.....	69
3.4	Métodos Bioquímicos.....	70

3.4.1	Extracción proteica.....	70
3.4.2	Cuantificación proteica.....	71
3.4.3	Preparación de las muestras para electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida	72
3.4.4	<i>Western blot</i>	72
3.4.4.1	Electroforesis desnaturalizante y reductora.....	72
3.4.4.2	Transferencia húmeda	74
3.4.4.3	Bloqueo de membrana, incubación con anticuerpos y revelado...	75
3.4.4.4	Anticuerpos utilizados en los <i>Western Blots</i>	76
3.4.5	Inmunoprecipitación.....	76
3.5	Métodos de Biología Celular.....	77
3.5.1	Fraccionamiento celular	77
3.5.2	Inmunofluorescencia	78
3.5.2.1	Anticuerpos utilizados en las inmunofluorescencias.....	79
3.5.2.2	Obtención y análisis de las imágenes	79
3.5.3	Cuantificación de la translocación nuclear de N1ICD mediante ensayo de InCell	80
3.5.4	Ensayo de proliferación por incorporación de bromodesoxiuridina.....	80
3.5.5	Activación/Inhibición de la vía de Notch	81
3.6	Métodos funcionales.....	82
3.6.1	Ensayo de cicatrización <i>in vitro</i>	82
3.6.2	Ensayo de migración mediante cestillo	82
3.7	Análisis estadísticos.....	83
4	RESULTADOS	84
4.1	La sobreexpresión de HIF-1 α induce cambios en la expresión génica y proteica de las MSCs.....	86
4.2	La sobreexpresión de HIF-1 α en MSCs potencia la vía de señalización Notch	88

4.3	HIF-1 α incrementa la expresión de ligandos funcionales de la vía de Notch en MSCs	89
4.4	Implicación de Notch en la migración de las células MSCs con expresión estable de HIF-1 α	91
4.5	La proliferación mediada por HIF-1 α de las MSCs es independiente de la vía de Notch.....	93
4.6	La proliferación de MSCs mediada por HIF-1 α es dependiente de SUMO 94	
4.7	Las vías de señalización de HIF-1 α y Notch están relacionadas a través de la SUMOilación.....	95
4.8	SUMO1 modifica postraduccionalmente a N1ICD.....	97
4.9	La SUMOilación de N1ICD aumenta su translocación al núcleo en células MSCs. 98	
4.10	La SUMOilación inducida por HIF-1 α media la migración de las MSCs a través de Notch1	100
4.11	La SUMOilación de N1ICD en células HEK 293T aumenta en condiciones de hipoxia	101
4.12	Las mutaciones puntuales en los sitios de SUMOilación de N1ICD, modifican su localización subcelular y modulan su actividad transcripcional en las células HEK 293T	105
4.13	La mutación K2150P-N1ICD inhibe la translocación de N1ICD al núcleo en células MSCs.	110
5	DISCUSIÓN	116
5.1	Modulación de la vía de Notch en MSCs en presencia o ausencia de HIF-1 α 118	
5.2	Respuesta molecular y celular de los mutantes K2049P_N1ICD y K2252P_N1ICD.	122
5.3	Respuesta molecular y celular del mutante K2150P_N1ICD.....	124
5.4	Papel dual de la SUMOilación de N1ICD en las MSCs y modulación de sus propiedades migratorias y proliferativas	126
6	CONCLUSIONES	129

ANEXO	132
BIBLIOGRAFÍA	134

ABREVIATURAS

A.A	Ácido anacárdico
ACTB	Actina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ANK	Anquirinas
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNT	Proteína translocadora del receptor nuclear
ASGCT	Sociedad Americana de Terapia Génica y Celular
ATP	Adenosín trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
bHLH	Dominio hélice-bucle-hélice básico
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino
CBP	Proteína de unión a CREB
CCR	Receptor de quimioquinas C-C
CCL	Quimioquinas C-C
Cebador D	Cebador directo
Cebador R	Cebador reverso
C-TAD	Dominio de activación transcripcional C-terminal
CXC	Quimioquinas CXC
CXCR	Receptor de quimioquinas CXC
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol

DH5α	<i>Douglas Hanahan 5α</i>
DII	<i>Delta-like</i>
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DSL	Dominio Delta-Serrata-Lag-2
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicol bis (amino-etil éter) N' tetra acético
EPO	Eritropoyetina
FAL	Fosfatasa alcalina granulocitaria
FBS	Suero fetal bovino
GFP	Proteína verde fluorescente
HBSs	Sitios de unión a HIF
HD	Dominio de heterodimerización
HEK 293T	Células embrionarias de riñón humano 293 varia
HIF	Factor inducible por hipoxia
HLA	Complejo de histocompatibilidad
MSC	Células mesenquimales estromales
HREs	Del inglés <i>Hipoxia Responsive Elements</i>
HRP	Peroxidasa de rábano picante
ICM	Masa celular interna
ID	Dominio de inhibición
IF	Inmunofluorescencia
IL-1β	Interleuquina 1 β
IP	Inmunoprecipitación

iPSCs	Células madre pluripotentes inducidas
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
Jag	Jagged
LB	Luria Bertani
LNR	Región Lin12/Notch
MAML1	Proteína tipo <i>Mastermind 1</i>
N1ICD	Dominio intracelular de Notch 1
NECD	Dominio extracelular de Notch
NEM	N-etilmaleimida
NGS	Suero de cabra neonata
NL	Tampón de lisis nuclear
NLS	Secuencia de localización nuclear
NRR	Región reguladora negativa
N-TAD	Dominio de activación transcripcional N-terminal
O.n	Durante toda la noche
ODD	Dominio de degradación dependiente de oxígeno
P/S	Penicilina/estreptomicina
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PER	Proteína del periodo circadiano
PEST	Dominio rico en P (prolina), E (ácido glutámico), S (serina), T (treonina)
PHDs	Polihidroxilasas
PVDF	Polivinildifluoruro
pVHL	Prolín-hidroxilasa von Hippel-Lindau

r.p.m	Revoluciones por minuto
RBPJ	Proteína recombinante de unión supresora de calvicie
RO	RO4929097
RTqPCR	Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa a tiempo real
SAE1/2	Enzimas activadoras de SUMO 1 y 2
SD	Desviación estándar
SDS-PAGE	Dodecil sulfato sódico-gel de poliacrilamida para electroforesis
SENP	Proteasa Setrín-SUMO específica
SF	Tampón de fraccionamiento subcelular
SIM	Proteína <i>Single-Mined</i>
SUMO	Del inglés <i>Small Ubiquitin-related modifier</i>
TBS	Tampón tris salino
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TMF	Fragmento transmembrana
UBC9	Enzima conjugadora de SUMO
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	<i>Western blot</i>

RESUMEN

En las últimas décadas, las células troncales o células madre han generado un gran interés en diversas áreas de la medicina y la investigación biomédica, sobre todo en campos como la regeneración y terapia celular.

Las células mesenquimales estromales, pertenecientes al tipo de células madre adultas, están en el punto de mira en este campo debido a sus características biológicas favorables como su multipotencia, efecto paracrino, propiedades inmunomoduladoras, conducta migratoria, así como a la ausencia de connotaciones ético-morales.

Uno de los problemas principales del mantenimiento de las células madre en cultivo es la rapidez con la que estas células se vuelven senescentes, habiéndose demostrado que cultivar estas células en condiciones de hipoxia favorece el mantenimiento de las características primordiales de las células madre.

La habilidad de percibir y responder a cambios en la concentración de oxígeno es una propiedad fundamental de las células eucariotas. Dicha propiedad conduce a la adaptación del metabolismo celular y a la regulación de la transcripción génica mediante los factores inducibles por hipoxia (HIF), siendo el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) el mecanismo molecular mejor descrito para el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno.

Por otra parte, una de las principales vías implicadas en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre es la vía de Notch, que modula la transcripción en diversos tipos celulares, vinculando la decisión del destino celular de una célula a la de la célula vecina.

Los efectos de Notch en el mantenimiento de la indiferenciación celular o en la iniciación de la diferenciación son dependientes de ambiente y tiempo, garantizando así un equilibrio adecuado entre las células madre y su progenie, interfiriendo o favoreciendo el compromiso celular.

Numerosos artículos relacionan las vías HIF y Notch, pero todavía permanecen por esclarecer diversos puntos de la interacción entre ambas vías.

La SUMOilación es una modificación postraduccional mediante la cual se une de manera covalente la pequeña proteína SUMO (Small Ubiquitin-related modifiers) a

otras proteínas. Las consecuencias de la SUMOilación son diversas y dependen de la proteína que ha sido modificada. Las funciones que se ven alteradas mediante esta modificación son la transcripción, la proliferación, la reparación del ADN y la localización nuclear entre otras.

Dada la relación ya descrita entre la hipoxia y la modificación postraduccional SUMO surge este trabajo, donde se describe la interacción entre las vías de HIF, Notch y SUMO. A lo largo de este estudio, hemos relacionado la estabilización de HIF-1 α con el incremento directo de los niveles generales de SUMO1 y con la consecuente SUMOilación de las proteínas. Entre la SUMOilación de diferentes proteínas incluimos el dominio intracelular de Notch 1 (NICD), modificación no descrita hasta el momento.

En la presente tesis, esclarecemos los mecanismos de interacción entre estas tres vías altamente conservadas en eucariotas y describimos los sitios clave de SUMOilación de NICD. Por otra parte, dilucidamos cómo esta interacción modula el comportamiento de las células mesenquimales estromales con el fin de poder mejorar sus propiedades en vistas a su uso terapéutico.

SUMMARY

In the past few decades, stem cells have generated great interest in different areas of medicine and biomedical research, especially in fields such as regenerative medicine and cell therapy.

Mesenchymal stromal cells, belonging to the group of adult stem cells, are in the spotlight in this field due to their favorable biological characteristics, as well as multipotency, paracrine effects, immunomodulatory properties, migratory behavior or the absence of ethical-moral connotations.

One of the main problems of the maintenance of the stem cells in culture is that these cells become senescent in few passages. Our group and others have been shown that culture mesenchymal stromal cells as well as other kind of stem cells under hypoxic conditions, favors the maintenance of the main characteristics of the stem cells.

The ability to perceive and respond to changes in oxygen concentration is a fundamental property of eukaryotic cells. This property leads to the adaptation of cellular metabolism and the regulation of gene transcription by hypoxia-inducible factors (HIF), being the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) the best-described molecular mechanism to maintain oxygen homeostasis.

In addition, one of the pathways involved in maintaining the undifferentiated state of stem cells is the Notch pathway., that modulates transcription of a wide variety of cell types linking the fate of neighboring cells. Effects of Notch in the maintenance of stem properties or initiation of differentiation is environment and time dependent, thus ensures a proper balance between stem cells and their progeny, interfering or promoting cell commitment.

Currently, there are articles in which the HIF and Notch pathways are related, but several points of this interaction between both pathways still remain to be clarified.

SUMOylation is a posttranslational modification where a small protein called SUMO (Small Ubiquitin-related modifiers) are covalently bound to other proteins. The several consequences of SUMOylation depend on the protein that has been modified. The functions that are altered by this modification include transcription, proliferation, DNA repair and nuclear localization among others.

Given the already described relationship between hypoxia and the posttranslational modification SUMO, this work emerges, where the interaction between the HIF,

Notch and SUMO pathways is described. Throughout this study, we have been related the stabilization of HIF-1 α with the direct increase of the general levels of SUMO1 and with the consequent protein SUMOylation including the intracellular domain of Notch 1 (N1ICD), modification not described until now.

In the present thesis, we clarify the mechanisms of interaction between these three highly conserved pathways in eukaryotes and described the key SUMOylation sites of N1ICD. Furthermore, we elucidate how this interaction modulates the behavior of mesenchymal stromal cells in order to improve their properties in view of a therapeutic use.

RESUM

En les últimes dècades, les cèl·lules troncales o cèl·lules mare han generat un gran interès en diverses àrees de la medicina i la investigació biomèdica, sobretot en camps com la regeneració i teràpia cel·lular.

Les cèl·lules mesenquimals estromals, pertanyents al tipus de cèl·lules mare adultes, estan en el punt de mira en aquest camp per les seves característiques biològiques favorables com la multipotència, efecte paracrí, propietats immunomoduladores, conducta migratòria així com a l'absència de connotacions ètic-morals.

Un dels principals problemes del manteniment de les cèl·lules mare en cultiu és la rapidesa amb la qual aquestes cèl·lules es tornen senescents, havent-se demostrat que cultivar aquestes cèl·lules en condicions d'hipòxia afavoreix el manteniment de les característiques primordials de les cèl·lules mare.

L'habilitat de percebre i respondre a canvis en la concentració d'oxigen és una propietat fonamental de les cèl·lules eucariotes. Aquesta propietat condueix a l'adaptació del metabolisme cel·lular i a la regulació de la transcripció gènica mitjançant els factors induïbles per hipòxia (HIF), sent el factor induïble per hipòxia 1 (HIF-1) el mecanisme molecular millor descrit per al manteniment de l'homeòstasi de l'oxigen.

D'altra banda, una de les vies implicades en el manteniment de l'estat indiferenciat de les cèl·lules mare és la via de Notch, que modula la transcripció en diversos tipus cel·lulars, vinculant la decisió del destí cel·lular d'una cèl·lula a la de la cèl·lula veïna. Els efectes de Notch en el manteniment de la indiferenciació cel·lular o en la iniciació de la diferenciació són dependents d'ambient i temps, garantint així un equilibri adequat entre les cèl·lules mare i la seva progènie, interferint o afavorint el compromís cel·lular.

Nombrosos articles relacionen les vies HIF i Notch, però encara romanen per aclarir diversos punts de la interacció entre les dos vies.

La SUMOilació és una modificació postraduccional mitjançant la qual s'uneix de manera covalent la proteïnaSUMO (Small ubiquitin-related modifiers) a altres proteïnes. Les conseqüències de la SUMOilació són diverses i depenen de la proteïna que ha estat modificada. Les funcions que es veuen alterades mitjançant aquesta modificació són la transcripció, la proliferació, la reparació de l'ADN i la localització nuclear entre d'altres.

Donada la relació ja descrita entre la hipòxia i la modificació postraduccional SUMO surgeix aquest treball, on es descriu la interacció entre les vies de HIF, Notch i SUMO. Al llarg d'aquest estudi, hem relacionat l'estabilització d'HIF-1 α l'increment directe dels nivells generals de SUMO1 i amb la conseqüent SUMOilació de diferents proteïnes. Entre la SUMOilació de diferents proteïnes incloem el domini intracel·lular de Notch 1 (N1ICD), modificació no descrita fins al moment.

En la present tesi, aclarim els mecanismes d'interacció entre aquestes tres vies altament conservades en eucariotes i descrivim els llocs clau de SUMOilació de N1ICD. D'altra banda dilucidem com aquesta interacció modula el comportament de les cèl·lules mesenquimals estromals per tal de poder millorar les seves propietats en vistes al seu ús terapèutic.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Terapia Celular

La terapia celular es un campo de la investigación biomédica que tiene como objetivo el tratamiento de diversas enfermedades desde el punto de vista celular, es decir, se pretende restaurar una cierta población celular dañada o utilizar las células como vehículos de carga terapéutica.

Según la Sociedad Americana de Terapia Génica y Celular, la terapia celular se define como la administración al paciente de células vivas enteras para el tratamiento de una enfermedad.

Haciendo un poco de historia, la terapia celular, se remonta a principios de 1800, cuando el doctor Charles-Edward Brown-Séquard inyectó en humanos extractos de testículos de animales para detener los efectos del envejecimiento. Casi un siglo después, en 1912, el doctor Alexis Carrel ganó el premio Nobel de Medicina como pionero en trasplantes de órganos y tejidos. Uno de los discípulos más reconocidos del Dr. Carrel fue el Dr. Paul Niehans, a quien se le debe el mayor auge de la terapia celular en los años treinta, descubriendo por casualidad la terapia celular al separar células paratiroides de un becerro e inyectarlas en un paciente crítico durante una cirugía tiroidea. Por otro lado, en el año 1988 se trasplantaron células madre de sangre de cordón umbilical con el fin de regenerar la sangre y las células del sistema inmune en un niño con anemia de Fanconi. En 1997, se realizó la misma operación, pero en un adulto que sufría leucemia mieloide crónica. Por otra parte, uno de los tratamientos médicos bien establecidos para muchas enfermedades es el trasplante de médula ósea, que también supone un ejemplo de terapia celular y se utiliza en patologías como la inmunodeficiencia y el cáncer. Conforme surgen avances en el campo, el repertorio de células con capacidades terapéuticas para administrar en humanos va aumentando. En España, según lo publicado por la Red de Terapia Celular Española (TerCel) se están llevando a cabo actualmente 122 ensayos clínicos en los cuales se está estudiando la capacidad terapéutica de la infusión de células, algunos de estos ensayos han logrado resultados prometedores y se encuentran en fases avanzadas ¹.

Respecto al origen de las células madre, éstas pueden ser del mismo individuo al que se le infunden o trasplantan (fuente autóloga) o bien de otro individuo (fuente alogénica) y pueden derivar de diferentes orígenes como la médula ósea, el tejido adiposo, la pulpa dentaria y otros tejidos. En el ámbito clínico, las estrategias de tratamiento con terapia celular incluyen el aislamiento y la transferencia de poblaciones de células madre específicas, aunque en el entorno preclínico se han desarrollado otras estrategias como la edición génica o la administración de células

embrionarias o derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) como se explicará más adelante.

1.2 Células madre

Las células madre tienen el potencial de diferenciarse en distintos tipos celulares, hecho que ocurre durante las primeras etapas del desarrollo. Además, en muchos tejidos, las poblaciones de células madre se dividen y diferencian de forma controlada, lo que permite la reparación tisular durante la homeostasis. Las células madre se distinguen del resto de tipos celulares por dos características importantes. En primer lugar, son células no especializadas capaces de renovarse a través de la división celular, incluso tras largos períodos de inactividad, es decir, se dividen de manera simétrica, generando una nueva célula madre. En segundo lugar, bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, pueden ser inducidas para transformarse en células específicas de tejidos u órganos con funciones especializadas, o pueden dividirse generando una célula especializada; hablamos de división asimétrica. En algunos órganos, como el intestino y la médula ósea, las células madre se dividen regularmente para reparar y reemplazar los tejidos desgastados o dañados. Sin embargo, en otros órganos como páncreas o corazón, estas células sólo se dividen bajo condiciones especiales y en tasas de replicación muy bajas.

La comunidad científica ha trabajado principalmente con dos tipos de células madre: células madre embrionarias y células madre somáticas o adultas. En el año 1981 se describió por primera vez una forma de aislar y cultivar células madre embrionarias de ratón². El estudio detallado de la biología de estas células madre de ratón condujo al descubrimiento en 1998 de un método para derivar células madre de embriones humanos y cultivarlas en el laboratorio³. Estas células, son las denominadas células madre embrionarias humanas.

En el año 2007 se consiguió otro gran logro al identificar las condiciones que permitían a determinadas células adultas especializadas, como los fibroblastos, ser reprogramadas genéticamente para adquirir un estado similar a las células madre embrionarias. Mediante la expresión de cuatro genes exógenos: Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4, Shinya Yamanaka y John Gurdon consiguieron generar por primera vez las iPSCs⁴. Este hallazgo supuso para ambos el premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 2012.

Dadas sus habilidades únicas de diferenciación otros tipos celulares, las células madre ofrecen nuevos potenciales para el tratamiento de enfermedades como la diabetes⁵⁻⁷ o enfermedades cardíacas⁸⁻¹⁰. Sin embargo, queda mucho por hacer tanto en la investigación como en la clínica para comprender como utilizar estas células en medicina regenerativa ya que el principal problema que presentan, y que es una de sus características distintivas, es la de formar teratomas espontáneamente. Por este motivo, el principal uso que se le da hoy en día a estas células es el cribado de fármacos y el desarrollo de modelos celulares de enfermedad. Generalmente, la finalidad de estos ensayos es recapitular en el desarrollo normal de las células para poder identificar las situaciones clave que llevan a causar defectos de nacimiento, así como desarrollar una potente herramienta para la medicina personalizada.

La investigación sobre células madre continúa avanzando en el conocimiento sobre cómo se desarrolla un organismo a partir de una sola célula y cómo las células sanas reemplazan a las dañadas en organismos adultos, siendo posiblemente esta área, una de las más fascinantes de la biología contemporánea, pero como en todo, se plantean tantas nuevas preguntas como nuevos descubrimientos se logran.

Los factores específicos y las condiciones que permiten que las células madre sigan sin especializarse son de gran interés. Se han invertido muchos años y esfuerzo para aprender a derivar y mantener células madre en el laboratorio en estado indiferenciado. Las células indiferenciadas no tienen ninguna estructura específica de tejido que les permita realizar funciones especializadas; sin embargo, pueden dar lugar a células especializadas que incluyen todos los tipos celulares. La diferenciación es el proceso por el cual las células madre adquieren compromiso con un linaje celular y comienzan a adquirir las características fisiológicas, morfológicas y moleculares de su célula destino. Mientras se produce esta diferenciación, la célula generalmente pasa por varias etapas, las cuales están influenciadas tanto por el material genético de la célula como por señales externas que incluyen sustancias químicas secretadas por otras células, contacto físico con las células que la rodean y otras moléculas como microvesículas que se encuentran en el microambiente de la célula en diferenciación. La interacción de estas señales hace que el ADN de la célula madre adquiera marcas epigenéticas, que restringen la expresión de genes de pluripotencia y potencian la expresión de factores de transcripción específicos, que se transmitirán a través de la división celular.

1.2.1 Clasificación de las células madre

Existen dos sistemas de clasificación de las células madre¹¹. El primero de ellos las clasifica en función de su origen, ya sea embrionario o adulto. El segundo sistema las clasifica en función de su potencialidad, basándose en el grado de diferenciación que posee la célula madre de partida y la capacidad que tiene para originar diferentes tipos celulares.

1.2.1.1 Clasificación de las células madre en función de su origen

En función de su origen, las células madre se clasifican en dos grupos:

- **Células madre embrionarias**

Las células madre embrionarias son células aisladas a partir de la masa interna de un embrión en la etapa de blastocisto¹².

- **Células madre adultas**

Las células madre adultas están presentes en todos los tejidos de los organismos; de hecho, se ha descrito en la sangre^{13,14}, los músculos^{15,16}, el cerebro^{17,18}, la médula ósea¹⁹, la piel^{20,21}, los terceros molares^{22,23} o los dientes de leche²⁴, el hígado²⁵, el intestino^{26,27}, los ovarios²⁸ y los testículos²⁹ entre otros. Estas células tienen la capacidad de poder permanecer en estado de reposo durante períodos largos de tiempo, no dividiéndose incluso durante años hasta el momento en el que finalmente comienzan a dividirse como consecuencia de una lesión a nivel tisular o a una enfermedad. Las células madre adultas son células indiferenciadas, pero con cierto compromiso para diferenciarse a células de una de las tres capas embrionarias (mesodermo, ectodermo o endodermo) dependiendo del tejido en el que estén alojadas³⁰. Las células madre adultas se encuentran rodeadas de células especializadas de tejidos u órganos y poseen la capacidad de poder renovarse para producir la totalidad o algunos de los tipos principales de células especializadas del tejido u órgano donde se encuentran.

Las células madre adultas residen en zonas específicas de cada tejido que reciben el nombre de nicho de células madre, siendo habitual que exista un pequeño número de células madre en cada tejido. Uno de los objetivos principales de área de investigación de las células madre y de la terapia celular es conseguir técnicas que permitan expandir cultivos de células madre adultas con el fin de manipularlas y generar células de calidad para ser utilizadas en terapia. Las células madre adultas presentan una serie de beneficios en la medicina moderna con respecto a las embrionarias como son:

- Su alto potencial para la regeneración de tejidos humanos como el hueso³¹, la piel³², los nervios periféricos³³, el cartílago³⁴, el páncreas³⁵ o el riñón³⁶, entre otros. Al entrar en contacto con los tejidos dañados, el microambiente del nicho ejerce un potente efecto mediante señales paracrinas que promueven la activación de estas células.
- Su naturaleza inmunoprivilegiada que las convierte en células altamente beneficiosas para el trasplante autólogo. De este modo, se ven disminuidos los riesgos de complicaciones como el rechazo o reacciones injerto contra huésped, así como la necesidad de efectuar estudios de histocompatibilidad como los requeridos en trasplantes heterólogos.
- Su uso no plantea problemas éticos como los generados por las células madre embrionarias.

1.2.1.2 Clasificación de células madre en función de su potencialidad

La clasificación de las células madre en función de su capacidad para generar diferentes tipos de células especializadas:

- **Células madre totipotentes**

Pueden crecer y formar un organismo completo, tanto los componentes embrionarios (las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como los extraembrionarios (placenta). La célula madre totipotente por excelencia el cigoto³⁷.

- **Células madre pluripotentes**

Son células que no pueden formar un organismo completo, pero si cualquier tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios. Las células madre pluripotentes más estudiadas son las embrionarias. En la actualidad se utilizan como modelo para estudiar el desarrollo embrionario y para entender los mecanismos y la señalización que permiten a las células pluripotentes llegar a formar cualquier célula plenamente diferenciada del organismo ³⁸.

- **Células madre de pluripotencia inducida**

Estas células se obtienen a partir de células humanas adultas reprogramadas genéticamente con genes de pluripotencia⁴. Dichas células poseen el mismo potencial de crecimiento y diferenciación que las células madre embrionarias ⁴. Entre las ventajas técnicas más importantes de las iPSCs encontramos las siguientes: no inducen rechazo inmunológico por lo que son un sistema óptimo para el descubrimiento de fármacos específicos y personalizados y su obtención no requiere el empleo de embriones humanos.

- **Células madre multipotentes**

Son aquellas células madre que sólo pueden generar células de su mismo linaje de origen embrionario. Por ejemplo, las células madre mesenquimales solo pueden diferenciarse a estirpe mesodérmica.

- **Células madre unipotentes**

Las células madre unipotentes son células que sólo son capaces de diferenciarse a un tipo celular. Por ejemplo, los precursores tardíos del sistema hematopoyético (unidades formadoras de colonias)

1.2.2 Células estromales mesenquimales (MSCs)

Las células estromales mesenquimales (MSCs) son células multipotentes que se adhieren a plástico, tienen una morfología similar a fibroblastos, expresan un conjunto específico de antígenos de superficie y se diferencian de manera espontánea a adipocitos, condrocitos y osteocitos. Estas células fueron descubiertas en el

laboratorio del Dr Friedenstein en los años 70³⁹ y no fue hasta el año 1999 cuando surgió en la comunidad científica un gran aliciente por su utilización y manipulación como herramienta terapéutica⁴⁰. Clínicamente, estas células son de gran interés debido a su capacidad para modular el sistema inmunitario, así como por su potencial para regenerar diferentes tejidos. Sin embargo, la traslación de estas células a terapias se ha visto obstaculizada por su heterogeneidad. El principal problema con el que nos encontramos es la inexistencia de un marcador específico de MSC que nos permita aislarlas y caracterizarlas. En un intento de aumentar la consistencia en la definición y estandarización de las MSCs, la Sociedad Internacional de Terapia Celular propuso unos criterios mínimos para definir las MSCs humanas, estos criterios se basan en la adherencia al plástico, la multipotencia, la capacidad clonogénica y la expresión de un panel definido de antígenos de superficie⁴¹.

1.2.2.1 Caracterización biológica

Las MSCs fueron referidas inicialmente como células del estroma, conformada por una población mixta de fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y macrófagos. Son células de aspecto fibroide, con forma de huso, núcleo alargado y central y con dos o tres nucleolos. Se trata de una población escasa pero que en cultivo muestra una gran capacidad de expansión, capacidad clonogénica y de adherencia. Las MSCs además de presentar coloración positiva para la fosfatasa alcalina granulocitaria (FAL), sudán y esterasa, presenta una serie de marcadores que las definen como células mesenquimales estromales⁴² (Tabla. 1)

Marcadores negativos	Excluye
CD34	Células hematopoyéticas primitivas y células endoteliales
CD45	Leucocitos
CD11b y CD14	Monocitos y macrófagos
CD79α y CD19α	Células B
*HLA tipo II	Antígeno presente en células y linfocitos
Marcadores positivos	Función biológica
CD73	Cataliza la producción de adenosina extracelular desde AMP
CD90	Interacción célula-célula, célula-matriz y cicatrización
CD105	Homeostasis vascular, modula las funciones de TGF-β vía interacción con TGF-β RI y RII

Tabla. 1 Marcadores de MSCs propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular.

*HLA tipo II se expresa en MSCs estimuladas.

La ultraestructura de las MSCs ha permitido esclarecer que son positivas para vimentina, y que dicha proteína intracelular les proporciona su morfología característica. Adicionalmente, las MSCs presentan una amplia variedad de receptores de membrana pertenecientes a la familia de las quimioquinas como el receptor de quimioquinas CC (CCR), las quimioquinas CC (CCL) y quimioquinas CXC (CXCR), receptor de quimioquinas CSC (CXCR), todas ellas involucradas en la modificación de la respuesta de las MSCs. Las MSCs muestran un tremendo potencial para el tratamiento de muchas enfermedades, proviniendo dicho potencial de su capacidad para diferenciarse a varios linajes celulares, secretar factores solubles cruciales para la supervivencia y proliferación de la célula, modular la respuesta inmune y migrar al sitio exacto de la lesión ⁴³.

Las características principales de las MSCs se resumen en los siguientes puntos:

- **Potencial de diferenciación**

Como células madre multipotentes, las MSCs pueden diferenciarse tanto *in vitro* como *in vivo* en varios tipos celulares mesodérmicos como son los osteocitos, los adipocitos y los condrocitos. Además, exhiben una gran plasticidad dada su capacidad de transdiferenciarse o de alterar bruscamente su fenotipo dando lugar a las características típicas de las células pertenecientes a diferentes linajes. Se ha documentado que las MSCs pueden transdiferenciarse *in vitro* a células no mesodérmica incluyendo células neuronales, hepatocitos e incluso islotes pancreáticos ⁴⁴. El potencial de diferenciación y transdiferenciación de las MSCs ha contribuido a aumentar el interés por estas células, y a su vez, ha promovido nuevas perspectivas clínicas, por ejemplo, se ha conseguido diferenciar MSCs a queratinocitos y múltiples tipos celulares epiteliales, contribuyendo así a procedimientos de reparación de heridas^{32,45}. En general, las MSCs podrían beneficiar la reparación de órganos y tejidos dada la capacidad de estas células de diferenciarse en células del tejido objetivo y reemplazar las residentes dañadas.

- **Capacidad inmunomoduladora**

La capacidad de las MSCs para modular el sistema inmunitario se demostró por primera vez en el 2000, siendo efectivas para tratar trastornos del sistema inmune tanto en humanos como en modelos animales ^{46,47}. Aunque el mecanismo por el cual

estas células ejercen su función inmunomoduladora todavía sigue sin ser comprendido en su totalidad, la teoría más aceptada es el contacto célula-célula y/o la liberación de factores inmunosupresores solubles. Se han llevado a cabo estudios tanto *in vitro* como *in vivo* donde se ha observado la interacción de las MSCs con un amplio rango de células del sistema inmune, mostrando una gran capacidad para suprimir la respuesta excesiva de las células T, B, dendríticas, macrófagos y células *Natural Killer* ^{48,49}. Por otra parte, dado que el daño tisular causado por la inflamación es un proceso clave desencadenado por la respuesta a una lesión o enfermedad, las MSCs podrían convertirse en un buen candidato para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación crónica, como la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal. En la actualidad se ha propuesto que las MSCs interactúan con sus entornos tanto regulando negativamente la respuesta inmune en el caso de inflamación aguda como estimulando el sistema inmune para liberar moléculas proinflamatorias si el nivel de citoquinas inflamatorias es bajo ⁵⁰.

- **Efecto paracrino**

Los beneficios de las MSCs son en gran parte debidos a la capacidad secretora de una amplia variedad de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, así como de microvesículas. La literatura sugiere que el papel clave de las MSCs en la interacción con el microambiente implica la liberación de diversos factores biológicamente activos que ejercen efectos en la dinámica celular local. También se ha demostrado que los factores liberados por las MSCs pueden evitar que las células adyacentes entren en apoptosis y estimulen su proliferación, promoviendo así la regeneración del tejido lesionado ⁵¹.

- **Tropismo**

La capacidad trófica, “*homing*” en inglés de las MSCs radica en su capacidad para alcanzar el tejido dañado en respuesta a una combinación de las moléculas de señalización del tejido lesionado y los correspondientes receptores presentes en las MSCs. Se han llevado a cabo estudios en diferentes modelos, donde se demostró que la migración de las MSCs era específica hacia tejidos dañados que mostraban inflamación ^{52,53}.

1.2.2.2 Fuentes de aislamiento de MSCs

Las MSCs se obtienen de diferentes tejidos bien adultos o fetales, incluyendo la médula ósea⁵⁴ (principal fuente de aislamiento de MSCs), el tejido adiposo⁵⁵, el páncreas⁵⁶, el hígado⁵⁷, la dermis⁵⁸, la membrana sinovial⁵⁹, la sangre de cordón umbilical⁶⁰, el tejido pulmonar⁶¹, la pulpa dentaria⁶² y el ligamento periodontal⁶³. No obstante, los tejidos más empleados son la médula ósea, la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo. Aunque la médula ósea es la mejor fuente de obtención, las MSC sólo suponen el 0.003% de las células mononucleares⁶⁴. Sobre la obtención de MSCs a partir de sangre de cordón umbilical, este procedimiento requiere optimizar puntos críticos para lograr el éxito del cultivo, tales como el tiempo de recolección y procesamiento, así como el volumen de sangre recolectado. Respecto al aislamiento y cultivo a partir de tejido adiposo, las células obtenidas de esta fuente tienen una morfología, fenotipo y capacidad de diferenciación *in vitro* similar a las obtenidas de médula ósea, aunque tienen una mayor capacidad de proliferación y es posible acceder más fácilmente a muestras de tejido adiposo a través de procedimientos como liposucción o abdominoplastia^{54,65}. Las MSCs de pulpa dentaria se obtienen de pacientes jóvenes entre 15 y 24 años de edad, sanos, de ambos sexos, cuyos terceros molares retenidos se extraen quirúrgicamente por razones de tratamiento.

Curiosamente, las MSCs de pulpa dentaria exhiben una mayor tasa de proliferación *in vitro* en comparación con las derivadas de médula ósea. Esto puede atribuirse al estado de desarrollo de los respectivos tejidos, ya que los terceros molares son los últimos dientes permanentes que se desarrollan completamente y que emergen, por lo tanto, tienen un estado de desarrollo más temprano en comparación con la médula ósea adulta. La naturaleza heterogénea de las MSCs derivadas de pulpa dental puede reflejar diferencias en sus etapas de desarrollo o incluso puede formar diferentes linajes de células de la pulpa^{62,66}.

1.2.2.3 Ensayos clínicos con MSCs

Los ensayos clínicos son un pilar esencial en el desarrollo de nuevas terapias basadas en el uso de la Terapia Celular. La Red TerCel ha puesto en marcha numerosos estudios en España para comprobar la seguridad y eficacia del uso de células madre en diferentes enfermedades, de los cuales podemos destacar:

- Células madre cardiaca alogénicas como tratamiento del infarto agudo de miocardio (Fase II, inicio 2014, CORETHERAPIX).
- Tratamiento de la artrosis de rodilla mediante inyección intra-articular de células madre mesenquimales de médula ósea (Fase II, inicio 2012, Instituto científico y tecnológico de Navarra, S.A (ICT)).
- Ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado, comparativo y Add-on, en dos grupos paralelos para evaluar la eficacia y seguridad de las células madre mesenquimales autólogas derivadas de tejido adiposo expandidas (ASC), para el tratamiento de la patología fistulosa perianal compleja en pacientes sin enfermedad inflamatoria intestinal (Fase III, inicio 2012, Instituto de investigación sanitario Fundación Jiménez Díaz).

En la actualidad, en España hay 122 ensayos comenzados que se encuentran en reclutamiento de pacientes, Fase I, II y III.

El mantenimiento y expansión de las MSCs son factores claves para su uso como herramienta terapéutica, pero tras largos periodos de crecimiento *in vitro* las MSCs entran en senescencia replicativa^{67,68}. Para solucionar esta limitación, tanto nuestro grupo como otros, han propuesto el cultivo de MSCs a baja concentración de oxígeno o mediante sobreexpresión/estabilización del factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α) ayudando así a mantener las células en estado indiferenciado^{69,70}. HIF-1 α es un factor transcripcional clave en la regulación de la respuesta adaptativa a la hipoxia⁷¹, siendo muchas las proteínas que interactúan directamente con HIF-1 para incrementar o disminuir su función.

1.3 La hipoxia como inductora de respuesta de los sistemas biológicos.

El oxígeno es un sustrato esencial en el metabolismo celular, la bioenergética y la señalización. Como tal, está relacionado con la supervivencia y la función normal de las células eucariotas. La baja concentración de oxígeno genera una situación de hipoxia, la cual está asociada a diferentes procesos fisiológicos tanto en la homeostasis como en condiciones fisiopatológicas tales como el cáncer y las enfermedades isquémicas⁷². La habilidad de percibir y responder a cambios en la concentración de oxígeno es una propiedad fundamental de las células eucariotas. La regulación de la

transcripción génica mediante el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) representa el mecanismo molecular mejor descrito para el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno⁷³.

1.3.1 Respuesta a la hipoxia

La diferencia entre las células, tejidos u órganos no proviene de su dotación génica sino de la manifestación particular de los genes de cada tipo celular. En este contexto, los factores de transcripción actúan para orientar y adaptar la expresión génica hacia patrones determinados de respuesta, como por ejemplo la migración, la proliferación o el crecimiento y la supervivencia.

La respuesta a la hipoxia requiere de un alto nivel de coordinación. Este mecanismo incluye una serie de cambios que van desde variaciones en la expresión enzimática que adapta la producción de energía frente a una menor disponibilidad de oxígeno, hasta la puesta en marcha de la angiogénesis o incluso de apoptosis si la célula no es capaz de sobrevivir a circunstancias adversas extremas. Todos los organismos, procariotas y eucariotas, poseen mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno, los cuales son mecanismos esenciales para la producción de energía y supervivencia. En los mamíferos superiores, la respuesta a la hipoxia es compleja e incluye entre otras, adaptaciones de la función respiratoria y hemodinámica, del metabolismo intermedio y de la función renal. Estas adaptaciones se manifiestan en cambios hormonales, de mediadores y de actividad enzimática, e implican variaciones en la expresión de genes entre los que cabe destacar el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la eritropoyetina (EPO). La producción de estos factores se da gracias a la unión de HIF-1 a los elementos de unión HIF “*binding sites*” (HBSs) o a los elementos de respuesta “*hypoxia responsive elements*” (HREs), situados en los promotores de los genes diana de HIF. La respuesta a la hipoxia es integral y abarca todos los aspectos necesarios para proveer de oxígeno al organismo y conseguir un aprovechamiento más eficaz.

Hasta la actualidad se han identificado una gran cantidad de genes que se activan por HIF, incluyendo genes que codifican para proteínas que participan en funciones celulares que favorezcan la oxigenación tisular como la angiogénesis⁷⁴, el metabolismo energético⁷⁵, la eritropoyesis⁷⁶, la proliferación y viabilidad celular⁷⁷, el

remodelado vascular⁷⁸ y la apoptosis⁷⁹. Dichas proteínas se encuentran resumidas en la Fig. 1⁸⁰.

La inducción de vía HIF afecta tanto a factores citoprotectores^{81,82} (encargados de amortiguar el daño producido por la hipoxia) como a enzimas de transporte de hexosas⁸³ y enzimas glucolíticas^{84,85}, ambas necesarias para la adaptación metabólica inmediata y producción de ATP por vías anaerobias⁸⁶⁻⁸⁸. Por otra parte, también se activa la expresión de genes destinados al mantenimiento de la perfusión tisular^{81,89}, favoreciendo procesos como el trofismo vascular⁸¹, la producción de transportadores de oxígeno^{90,91} y la angiogénesis^{82,92}.

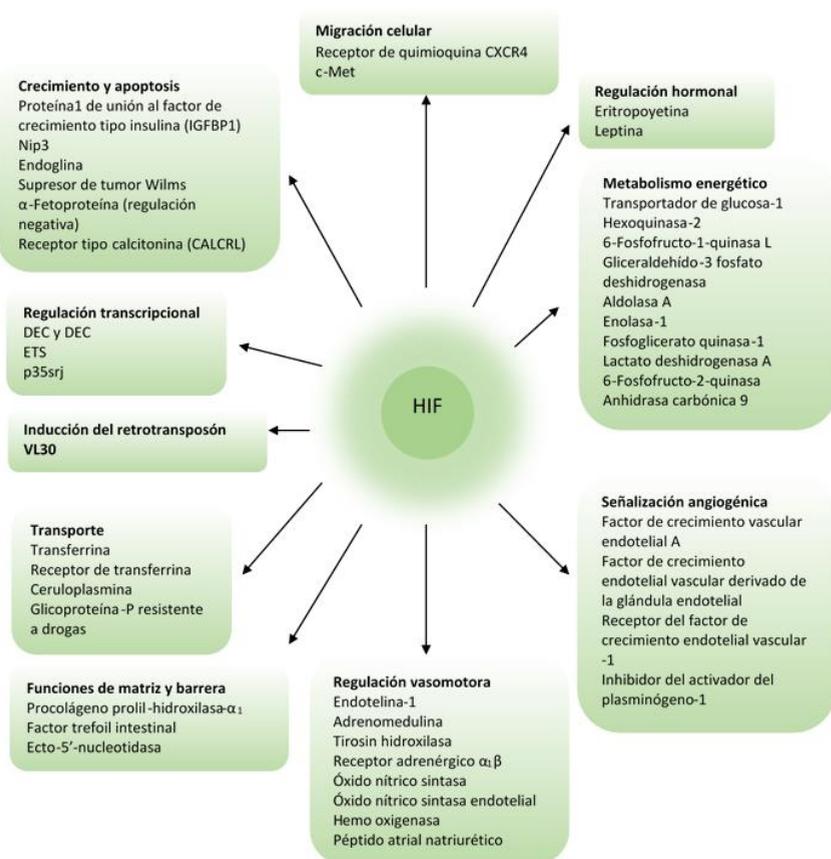


Figura. 1 Dianas transcripcionales directas de HIF. La figura muestra los productos proteicos de los genes para los cuales existe evidencia de activación transcripcional directa por el factor inducible por hipoxia (HIF)⁸⁰.

1.3.2 HIF-1 y otros miembros de la superfamilia de HIF

HIF-1 es un heterodímero que consiste en una subunidad α y una subunidad β . HIF-1 α es la subunidad que está altamente regulada por el nivel de oxígeno, mientras que HIF-1 β se expresa constitutivamente⁹³. Cada subunidad (Fig. 2), tiene un dominio hélice-bucle-hélice básico (bHLH) y un dominio PAS (PER-ARNT-SIM) consistente en una proteína del periodo circadiano (PER), una proteína translocadora del receptor nuclear Ah (ARNT) y una proteína *single-minded* (SIM)⁹⁴. La mitad N-terminal de HIF-1 α contiene los dominios bHLH y PAS que se requieren para la dimerización y la unión al ADN. La mitad C-terminal contiene los dominios necesarios para la degradación y la activación transcripcional: el dominio de degradación dependiente de oxígeno⁹⁵⁻⁹⁷ (ODD; confiere estabilidad dependiente de oxígeno), dos dominios de activación transcripcional independientes (N-TAD y C-TAD) y un dominio inhibidor (ID; regula negativamente los dominios TAD). Mientras que el TAD N-terminal (N-TAD) también constituye un dominio de degradación, el TAD C-terminal (C-TAD) funciona de manera estrictamente inducible por hipoxia⁹⁸. El C-TAD interactúa con co-activadores como p300/CBP (*CREB-binding protein*) independientemente de la estabilidad de la proteína y se requiere para la actividad completa de HIF⁹⁹.

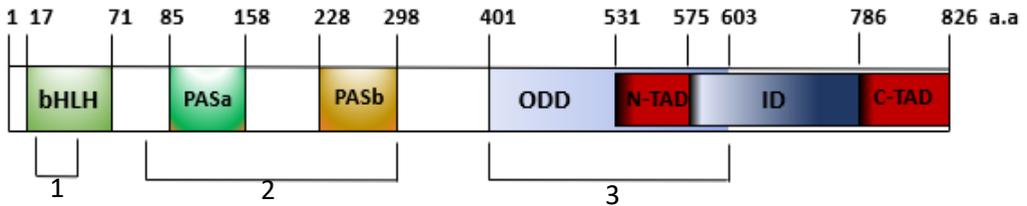


Figura. 2 Estructura del factor HIF-1 α . HIF-1 α contiene los dominios hélice-bucle-hélice básicos (bHLH) y PER-ARNT-SIM (PAS), involucrados en la dimerización con HIF-1 β y la unión al ADN. La región C-terminal contiene dos dominios de activación transcripcional (TAD) y el dominio de inhibición (ID). El N-TAD se encuentra dentro del dominio ODD. El dominio ODD regula la estabilidad de HIF-1 α vía reconocimiento por la prolina-hidroxilasa von Hippel-Lindau (pVHL) y la enzima E3 ubiquitinólisis. (1: Sitio de unión al ADN; 2: Sitio de unión a HIF-1 β ; 3: Región susceptible a modificaciones como hidroxilación, acetilación, ubiquitinación o SUMOilación)

Las búsquedas de homología en el banco de genes, así como experimentos de clonación, han demostrado la existencia de otros miembros de la superfamilia bHLH-PAS, entre las que se encuentra HIF-2 α , conocida también como proteína del dominio endotelial PAS1 (EPAS1), y HIF-3 α ¹⁰⁰. Estas isoformas tienen similitud estructural y

se clasifican como miembros de la familia bHLH-PAS. La estructura y las funciones de HIF-1 α se han estudiado más extensamente que las de HIF-2 α o HIF-3 α . Se han encontrado unas seis isoformas de HIF-1 α que varían en su grado de funcionalidad (Fig. 3). No se conocen tantos detalles sobre las funciones de las subunidades de clase 2 α y 3 α , pero si es conocido que las tres formas están reguladas por hidroxilación y degradación vía la ruta de la poliubiquitín-proteasoma¹⁰¹⁻¹⁰³.

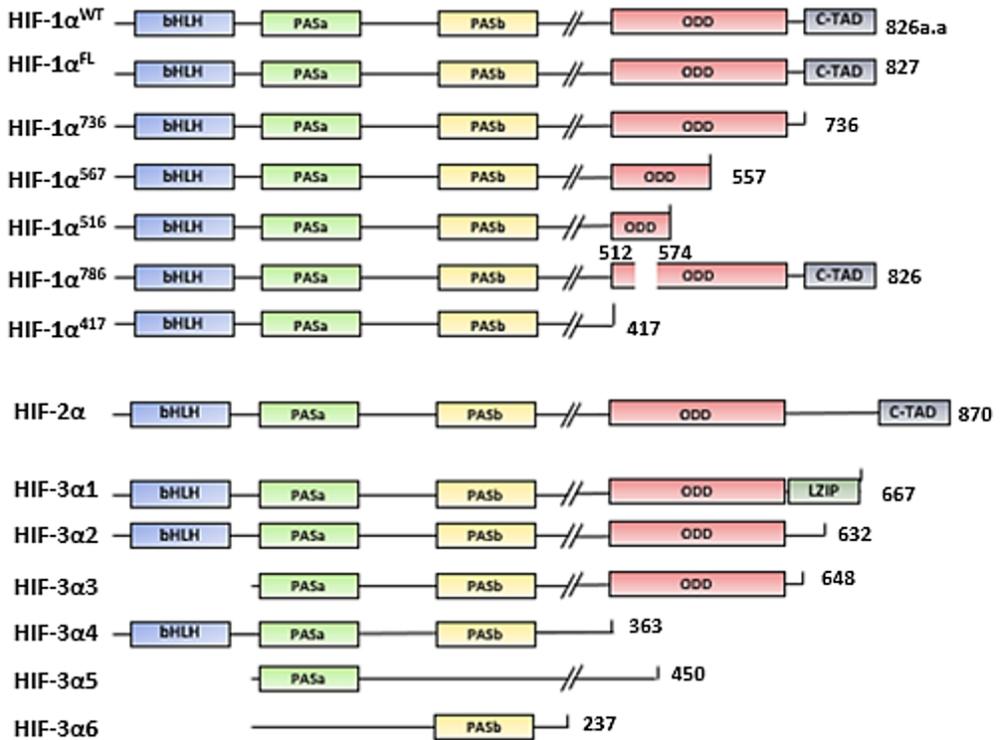


Figura. 3 Variantes de la subunidad HIF α . bHLH: hélice-bucle-hélice básico, PAS: dominio PER-ARNT-SLIM; ODD: dominio de degradación dependiente de oxígeno, N-TAD: dominio de activación transcripcional N-terminal, C-TAD: dominio de activación transcripcional C-terminal, LZIP: cremallera de leucina.

1.3.3 Activación de la vía HIF-1

HIF-1 está regulado principalmente por enzimas específicas polihidroxilasas (PHDs) iniciando su degradación a través de la proteína prolín-hidroxilasa von Hippel-Lindau (pVHL). En condiciones de normoxia y condiciones de hipoxia se generan dos situaciones muy diferentes que se detallan a continuación (Fig. 4)⁹⁶.

En condiciones de normoxia tanto las PHDs que hidroxilan prolinas conservadas, como FIH (Factor Inhibidor de HIF), una asparagil-hidroxilasa, hidroxilan HIF-1 α usando como cofactores α -cetoglutarato, oxígeno y hierro¹⁰⁴. Esta hidroxilación facilita la unión de pVHL a HIF-1 α . La pVHL forma un complejo de reconocimiento como sustrato de la ubiquitin E3 ligasa, dirigiendo a HIF-1 α a la poliubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma⁹⁶¹⁰⁵.

En condiciones de hipoxia, se bloquea la actividad de las PHDs y como consecuencia la unión de pVHL, ingresando HIF-1 α en el núcleo y heterodimerizando con HIF-1 β . Posteriormente este complejo se une a los HREs y HBSs y reclutan co-activadores de la transcripción como p300 o CBP, activando la expresión de diferentes genes anteriormente nombrados⁸⁰.

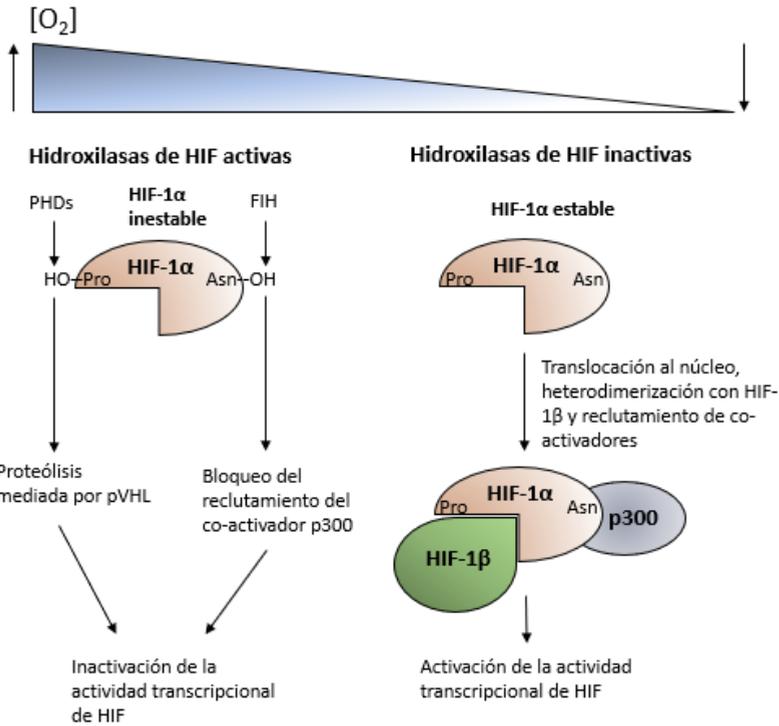


Figura. 4 Regulación dual de la subunidad HIF-1 α por prolin y asparagil hidroxilación. En presencia de oxígeno, las PHDs (hidroxila en ODD) reclutando las pVHL y consecutivamente las E3 ubiquitín ligasas, resultando en una degradación proteolítica de HIF-1 α vía proteasoma. Por otra parte, FIH (hidroxila en C-TAD) bloquea el reclutamiento del co-activador p300, resultando en la inactivación transcripcional de la subunidad HIF-1 α . En condiciones de hipoxia, las hidroxilasas de HIF son inactivas, y estos procesos se suprimen, permitiendo la formación del complejo transcripcional activo.

El factor HIF-1 interactúa con gran multitud de proteínas, como por ejemplo ciertas proteínas de la familia de las ciclinas, ERK¹⁰⁶, FOXA2¹⁰⁷, FOXP3¹⁰⁸, las histonas deacetilasas¹⁰⁹, las importinas¹¹⁰⁻¹¹², así como las proteínas Notch y SUMO⁸⁷. A continuación, dado el interés de estas últimas en este estudio, describiremos más en detalle las proteínas de la familia Notch¹¹³⁻¹¹⁵ así como de las proteínas SUMO¹¹⁶⁻¹¹⁸ (*Small-Ubiquitin like modifiers*).

1.4 Vía de señalización Notch, componentes y activación.

La vía de señalización Notch es una vía altamente conservada con una ruta directa desde la membrana hasta el núcleo y que funciona en muchos y diferentes procesos, tanto de desarrollo como homeostáticos. Se trata de una vía de señalización con muchos menos reguladores que otras, pero que genera una red muy bien modelada, presente desde en células sensoriales ciliadas hasta en redes ramificadas de arterias. Su actividad es sumamente compleja, ya que al igual que puede promover el crecimiento tisular, puede ser un elemento clave en cáncer bajo ciertas circunstancias, también está implicado en desarrollo embrionario, muerte celular y supresión tumoral entre otros procesos. Existen diferentes mecanismos que ayudan a dar forma a la actividad de la vía de Notch, generando los resultados funcionales más apropiados para cada contexto. Estos mecanismos incluyen la interacción receptor-ligando, la topología de los tejidos, el entorno nuclear y la conectividad de las redes reguladoras.

1.4.1 Activación de la vía de Notch

A pesar de que la activación de la vía de Notch se encuentra involucrada en respuestas muy diferentes, desde el desarrollo del sistema nervioso en mamíferos¹¹⁹ hasta la etiología de enfermedades^{120,121}, pasando por la regulación de células madre¹²²⁻¹²⁶ y la morfogénesis cardíaca¹²⁷⁻¹²⁹, la activación de la vía de Notch se produce mediante un proceso relativamente sencillo. La activación se produce mediante la unión de un ligando a un receptor, la cual induce un cambio conformacional del receptor y comienza una serie de escisiones proteolíticas de los miembros de la familia de los receptores Notch, produciendo la liberación del dominio intracelular de Notch (NICD)¹³⁰. Una vez se libera NICD, entra en el núcleo y, junto con la proteína de unión al ADN conocida como RBPJ (*Recombining binding protein suppressor of hairless*) y el co-activador MAML1 (*Mastering-like transcriptional co-activator 1*) entre otros, estimula la transcripción de los genes diana¹³¹ (Fig. 5). El dominio extracelular del receptor (NECD) es endocitado junto con el ligando por la célula presentadora y llevado a degradación vía lisosoma.

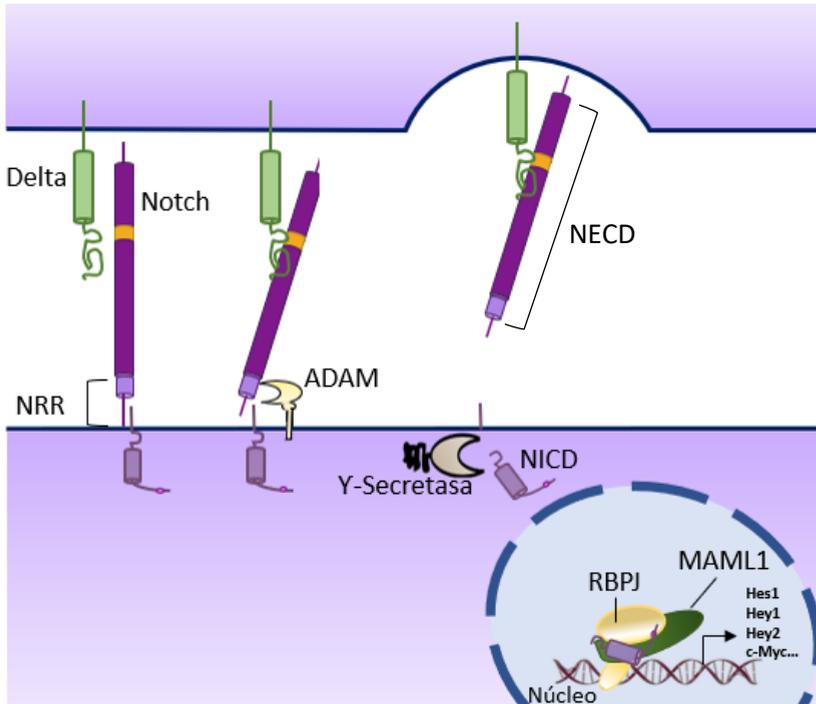


Figura. 5 Esquema del eje central de la vía. Cuando los ligandos canónicos de Notch (verde) se unen a los receptores Notch (morado; amarillo: repeticiones EGF (11-12); rosa: región reguladora negativa (NRR)) de la célula adyacente, se provocan dos escisiones proteolíticas, la primera llevada a cabo por ADAM10 y la segunda por Y-secretasa, que libera el dominio intracelular de Notch (NICD). En el núcleo, NICD interactúa con la proteína RBPJ y el co-activador MAML1 para promover la transcripción génica.

1.4.2 Receptores y ligandos de la vía de Notch

1.4.2.1 Receptores de la familia Notch

La familia de receptores transmembrana Notch consta de cuatro proteínas parálogas (Notch1-4) en humanos con funciones principales redundantes¹³² y no redundantes¹³³. Antes de la integración en la membrana plasmática, el receptor Notch se escinde en el sitio S1 (Fig. 6) situado a 70 aminoácidos de la zona N-terminal del dominio transmembrana. Esta escisión se produce dentro de la red trans-Golgi mediante una proteasa de tipo furina, lo que da como resultado un heterodímero que se mantiene

unido por enlaces iónicos dependientes de calcio¹³⁴. Los dos polipéptidos que constituyen la forma madura de Notch unida a la membrana se llaman dominio extracelular (NECD) y fragmento transmembrana (TMF). Mientras que el dominio NECD es exclusivamente extracelular, el TMF está compuesto por una pequeña porción extracelular de 70 aminoácidos, el dominio transmembrana y un dominio intracelular¹³⁵.

Comenzando por la región N-terminal, el NECD está formado por 29-36 dominios de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Notch1-2: 36, Notch3: 34 y Notch4: 29), de los cuales algunos son de unión a calcio (cbEGF12 contando desde la parte N-terminal). Este es el principal dominio de unión implicado en las interacciones receptor-ligando, mientras que otros sitios de tipo EGF contribuyen aumentando la estabilidad de la unión. Tras los dominios de tipo EGF está la región reguladora negativa (NRR) con tres repeticiones Lin12/Notch ricas en cisteína (LNR) y el dominio de heterodimerización (HD). Esta región conecta los polipéptidos TMF y NECD para formar el heterodímero Notch. La región NRR es crucial para prevenir la activación de Notch en ausencia de la señal correcta¹³⁶.

Dentro del TMF, la región C-terminal del dominio HD es la zona transmembrana. Contiene el sitio de escisión S3 (Fig. 6), que es el sustrato para la proteólisis intramembrana regulada por la Y-secretasa. Este evento ocurre sólo después de que se haya producido la escisión S2 que limita la velocidad, haciendo que S3 sea accesible para la Y-secretasa. La proteólisis de S3 da como resultado la liberación del dominio intracelular de Notch (NICD) de la membrana y permite que se inicie la señalización de Notch^{136,137}.

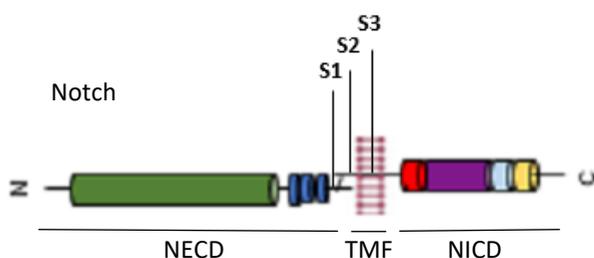


Figura. 6 Localización de los tres sitios de escisión del receptor Notch (S1-3). Estructura general de los receptores Notch. (NECD: Dominio extracelular de Notch; TMF: Fragmento transmembrana; NICD: Dominio intracelular de Notch).

A nivel morfológico existen diferencias entre los miembros de la familia de receptores (Fig. 7), los dominios intracelulares de Notch3 y 4 carecen de dominio de activación transcripcional (TAD), encargado de reclutar co-activadores y la región de anquirinas de Notch4 es ligeramente más corta. El dominio PEST (dominio rico en (P) prolina, ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T)) es el encargado de regular la degradación de NICD. Entre las repeticiones de anquirina (ANK) y PEST, NICD contiene diferentes señales de localización nuclear y la región TAD. Las mutaciones más comunes se localizan en los exones 26 y 27, que codifican para el HD, región esencial en la regulación de la actividad de Notch. Esta mutación desestabiliza el dominio HD y como consecuencia se pierde la actividad autoinhibidora, por lo que el receptor está constitutivamente activado. La segunda mutación más frecuente se localiza en el exón 34 que codifica para la región PEST. Esta mutación generalmente produce una proteína truncada generando comúnmente codones de parada. PEST es esencial para la rápida degradación de la proteína activada de Notch, y esta delección se traduce en el incremento de la vida media de la señal ¹³⁸.

1.4.2.2 Ligandos de la vía Notch

Los ligandos canónicos de Notch de la familia Delta/Serrata se clasifican en dos grupos principales dependiendo de si son homólogos de los ligandos Delta o Serrata de Notch de *Drosophila* (Fig. 7). Las proteínas de tipo Delta (Dll) incluyen Dll1, Dll3 y Dll4, mientras que los homólogos de Serrata están compuestos por Jagged1 (Jag1) y Jag2. Aunque se han atribuido diferencias funcionales a los cuatro receptores de Notch, la unión con Dll o ligandos de la familia Jagged conducen a la misma activación de la vía canónica ¹³⁹.

Los ligandos de Notch comparten una disposición modular común en sus dominios extracelulares que comprende el dominio N-terminal, múltiples repeticiones de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el dominio DSL (Delta/Serrata/Lag-2)¹⁴⁰. A pesar de la similitud en la organización general de los dominios extracelulares, existen algunas diferencias estructurales. Por ejemplo, el número de repeticiones de EGF varía al igual que su espaciado. Los ligandos Jagged 1 además, tienen una región rica en cisteínas que se encuentra ausente en la familia Dll. Los dominios intracelulares de los ligandos tienen un nivel menor de homología. Finalmente, el ligando Dll3 es el más diferente estructuralmente, ya que tiene degenerado el dominio DSL y además restos de lisinas del dominio intracelular que permiten la unión de

ubiquitinas por la E3 ligasa¹⁴¹. A diferencia de Dll1 que tanto activa como inhibe la vía de Notch, Dll3 funciona exclusivamente como antagonista de la vía por lo que los ligandos de Notch no son funcionalmente equivalentes.

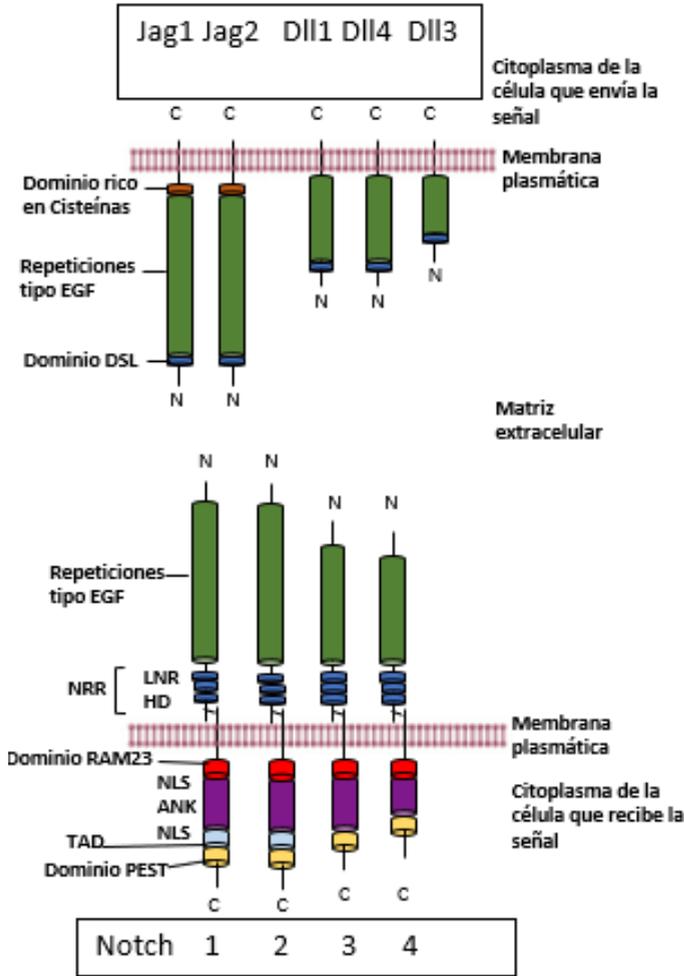


Figura. 7 Esquema de la familia de receptores Notch y sus ligandos. Estructura de los ligandos (células transmisoras de la señal) y receptores (células receptoras de la señal) en la superficie celular. (NRR, región reguladora negativa; LNR, repeticiones Lin12/Notch ricas en cisteína; NLS, secuencia de localización nuclear; TAD, dominio de activación transcripcional; DSL, Delta/Serrata/Lag-2; Jag, Jagged, Dll, tipo Delta).

1.4.3 Interacción receptor-ligando

La región reguladora negativa (NRR) del receptor de Notch, está formada por tres repeticiones Lin12/Notch (LNR, rosa) y el dominio de heterodimerización (HD, azul oscuro y azul claro), en su conjunto rodean el sitio de reconocimiento de la enzima ADAM haciéndolo inaccesible (Fig. 8). En el escenario figuran también tres repeticiones EGF del dominio extracelular de Notch (NECD), el módulo asociado RBPJ (RAM) y el primer dominio de repetición de anquirina (ANK1) situado en el dominio intracelular. La unión del ligando ejerce una fuerza sobre el receptor que desplaza los LNR, exponiendo el sitio de escisión para ADAM. Esta escisión hace que el fragmento transmembrana de Notch figure como sustrato para la proteólisis de la γ -secretasa y así se libere el NICD al citosol ¹³⁶.

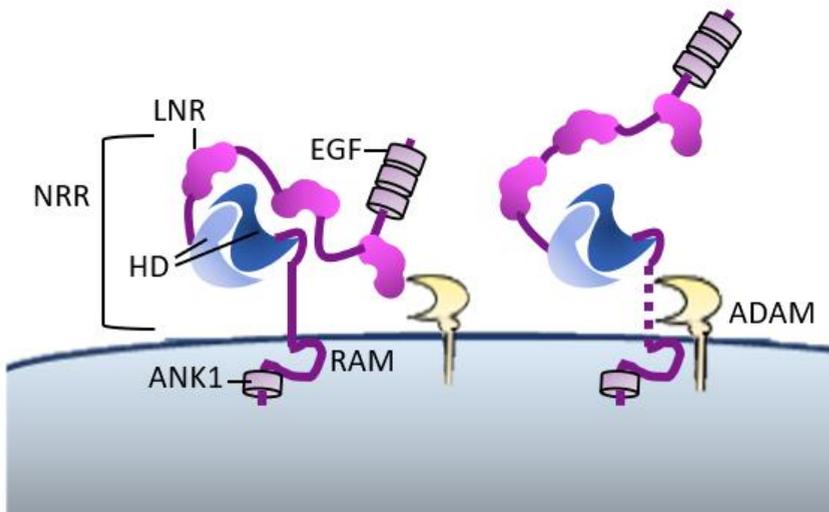


Figura. 8 Esquema de la oclusión de la NRR de Notch para las proteasas, basado en cristalografía ¹⁴². Se muestra cómo se ocluye el sitio de corte para ADAM hasta que se generan fuerzas a través de la unión ligando-receptor que hace accesible el sitio de proteólisis,

Es sabido que Notch1 interactúa con multitud de proteínas, y en los últimos años se han publicado estudios que relacionan Notch1 con SUMO. Se ha demostrado que tras la activación de Notch1 descienden los niveles de SUMO no conjugados, aumentando la sensibilidad a la inhibición de la cascada de SUMOilación ¹⁴³. A continuación, describimos la modificación postraduccional SUMO, así como sus implicaciones.

1.5 La proteína SUMO (*Small-Ubiquitin related Modifier*) implicaciones biológicas y proceso de conjugación.

La proteína SUMO (*Small-Ubiquitin related Modifier*) es un residuo que se une a las lisinas de sus proteínas diana. La adición de SUMO a las proteínas puede modular la capacidad de estas para interactuar con otras proteínas, alterar sus patrones de localización subcelular y conferir mayor estabilidad. SUMO influye en diferentes procesos biológicos, principalmente en la regulación transcripcional.

Se sabe que las modificaciones postraduccionales de las proteínas, como la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y SUMOilación, tienen papeles clave en muchos procesos celulares dada su capacidad de inducir cambios rápidos en las funciones de las proteínas, tanto a nivel de complejos proteicos como de estructuras subcelulares. La ubiquitinación y la SUMOilación son particulares ya que la modificación se produce a través de la adición de un pequeño polipéptido y no de un grupo químico. La conjugación de la ubiquitina a los residuos de lisina tiene un papel bien establecido en la degradación mediada por el proteasoma, pero también está involucrada en otras funciones celulares que incluyen la regulación de la traducción y el transporte intracelular ¹⁴⁴.

La proteína SUMO está estructuralmente relacionada con la ubiquitina, es de tamaño similar (11 kDa de la proteína SUMO frente a los 9 kDa de la ubiquitina) y también se une a residuos de lisina dentro de sus proteínas diana. En la SUMOilación, la lisina clave generalmente se sitúa dentro de un sitio consenso ψ -Lys-X-Glu (donde ψ es un aminoácido hidrofóbico grande, la mayoría de veces isoleucina o valina; Lys, lisina; X, cualquier residuo y Glu, ácido glutámico)¹⁴⁵. Aunque se han descubierto más sitios de SUMOilación que difieren del sitio consenso, los estipulados como ψ -Lys-X-Glu siguen siendo los más numerosos.

La modificación SUMO se presenta como una modificación versátil para una gran cantidad de proteínas y vías de señalización diferentes, ya que las consecuencias de estas modificaciones parecen ser tan diversas como sus dianas. La SUMOilación se relaciona con las interacciones proteína-proteína, la localización nuclear, las interacciones proteína-ADN, la actividad enzimática y también hay evidencias de que pueda actuar como antagonista de la ubiquitinación ¹⁴⁶.

Existen cuatro miembros conocidos de la familia SUMO en mamíferos, SUMO1-4,^{143,147}. Mientras que los miembros 1-3 han sido ampliamente estudiados, poco se sabe

de SUMO-4. Al igual que la ubiquitina, se ha demostrado que SUMO-2 y SUMO-3 tienen la capacidad de formar cadenas poliméricas, lo que sugiere que las modificaciones llevadas a cabo por SUMO-1, 2 y 3 podrían tener distintas consecuencias funcionales.

SUMO-2 y SUMO-3 difieren únicamente en tres aminoácidos N-terminales y son funcionalmente indistinguibles. Juntos, comparten entorno al 50% de homología con SUMO-1.

En relación con la hipoxia, se ha demostrado que la conjugación de SUMO-1 y SUMO-2/3 aumenta tras la isquemia focal en modelos de lesión cerebrovascular ¹⁴⁸, y en general los niveles de SUMO aumentan en condiciones de hipoxia ¹⁴⁹.

1.5.1 Vía de conjugación de SUMO a proteínas diana

La vía de la SUMOilación es análoga a la de la ubiquitinación, pero la conjugación de SUMO implica un conjunto diferente de enzimas (Fig. 9). El precursor de SUMO tiene aminoácidos adicionales en la región C-terminal que se escinden mediante la proteólisis mediada por las proteasas SENP (proteasa setrín-SUMO específica)¹⁵⁰. SUMO se activa gracias a la enzima activadora E1, que consiste en un heterodímero compuesto por las enzimas activadoras de SUMO subunidad 1 y 2 (SAE1 y SAE2), las cuales forman un puente tioéster con SUMO¹⁵¹. La proteína SUMO activada se transfiere a la enzima E2 (UBC9, enzima conjugadora de SUMO), y finalmente se une al grupo E-amino de una lisina específica en la proteína diana ¹⁵². Una vez SUMO se une al sustrato, se necesita la enzima específica SUMO E3-ligasa para una modificación eficiente.

La SUMOilación se revierte fácilmente mediante proteasas específicas. Estas enzimas parecen tener un papel doble, porque también pueden actuar como hidrolasas carboxiterminales en el procesamiento de SUMO hasta su forma madura.

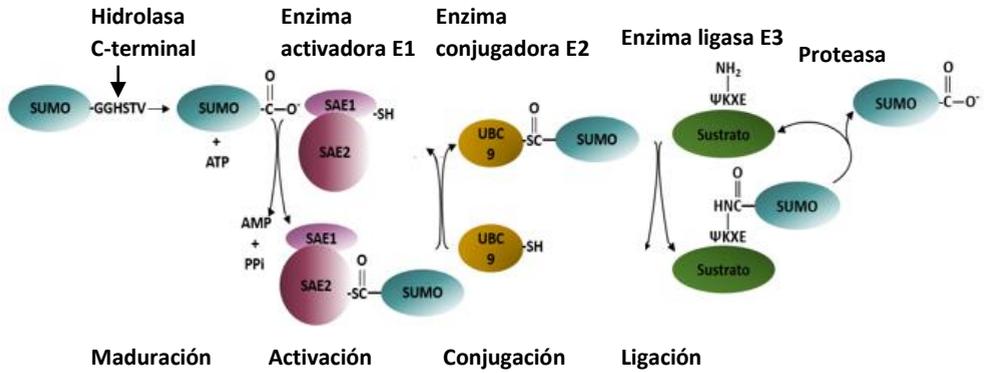


Figura. 9 Vía de conjugación de SUMO. SUMO se sintetiza como un precursor y se procesa mediante hidrolasas para hacer que la doble glicina C-terminal esté disponible para la conjugación. Posteriormente se conjuga con el sustrato mediante la activación llevada a cabo por la E1 (SAE1 y 2), la conjugación por E2 (UBC9) y la ligación mediante la enzima E3-ligasa. El enlace isopeptídico resultante es estable y su alteración requiere de enzimas deSUMOiladoras.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Las células mesenquimales (MSCs) poseen las cualidades adecuadas para su uso en terapia celular: son inmunomoduladoras, poseen un secretoma activo que influye en el entorno celular donde se implantan y son capaces de regenerar tejidos dañados. Además, no generan efectos adversos en el huésped donde se infunden, y por su seguridad y eficacia son unas de las células más utilizadas en el ámbito clínico.

Uno de los principales problemas asociado a la producción de MSCs es la dificultad para mantenerlas de forma prolongada en cultivo, pero tanto nuestro grupo de investigación como otros han demostrado la ventaja del cultivo de estas células en hipoxia moderada. En estas condiciones hay dos proteínas que juegan un papel fundamental, el factor inducible por hipoxia (HIF) y la proteína Notch, ambas implicadas en la biología de las células eucariotas cultivadas en bajas concentraciones de oxígeno, pero son necesarios más estudios acerca de cómo la interacción entre estas vías genera un perfil molecular específico capaz de modificar el comportamiento de las mismas.

En este escenario, y conociendo de antemano la relación entre HIF y SUMO, así como los efectos de la modificación postraducciona SUMO en células con la vía de Notch activa, generamos la hipótesis de trabajo en la cual se plantea que estas tres vías altamente conservadas interactúan entre sí de una manera sencilla y ordenada, de tal manera que un incremento de HIF generaría un incremento de SUMO que a través de la vía de Notch modificaría funciones celulares tales como la migración o la proliferación de las MSCs.

En este trabajo se describen los ensayos realizados para demostrar la interconexión de las tres vías, tanto en cultivos primarios de MSCs como en líneas celulares, así como su efecto en la potenciación de la supervivencia de las MSCs en bajas concentraciones de oxígeno, lo que ayudará al diseño de estrategias encaminadas a incrementar el potencial terapéutico de las MSCs y facilitar su uso en el ámbito clínico.

2.2 **OBJETIVOS**

Debido a la importancia tanto de las vías HIF y Notch como de la modificación postraduccional SUMO en numerosos procesos biológicos, la finalidad de esta tesis doctoral ha sido estudiar la interacción entre las proteínas HIF-1 α , Notch1 y SUMO1 en MSCs, además de su corroboración en la línea celular HEK 293T.

Por ello planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar el perfil molecular de la vía de Notch en cultivos de MSCs y MSCs que sobreexpresan HIF-1 α (HIF-MSCs).
2. Estudiar la influencia de la inhibición de la vía de Notch a nivel molecular y funcional (migración, invasión, proliferación) en MSCs y HIF-MSCs.
3. Estudiar la SUMOilación general en células MSCs y HIF-MSCs, así como su influencia a nivel molecular y funcional una vez se inhibe la SUMOilación.
4. Tratar de relacionar los resultados obtenidos entre HIF-Notch y HIF-SUMO.
5. Comprobar la interacción directa entre SUMO1 y Notch1 y cómo es modulada por la presencia/ausencia de HIF-1 α .
6. Determinar los sitios clave de SUMOilación del dominio intracelular de Notch1 (N1ICD) y cómo afecta su eliminación en el comportamiento molecular/celular.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Modelos celulares

3.1.1 Líneas celulares procariotas

Para la realización de la tesis se han utilizado dos cepas bacterianas pertenecientes a la especie *Escherichia coli*:

- Douglas Hanahan 5 α (DH5 α): Bacteria no patógena utilizada para la transformación de lentivirus. Genotipo: dlacZ Delta M15 Delta (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1.
- XL10-Gold ultra competentes: Bacteria utilizada para la transformación eficiente de moléculas de ADN de gran tamaño. Genotipo: TetrD(mcrA)183D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]

3.1.1.1 Medios de cultivo procariota

Ambas cepas bacterianas se crecieron en medio de lisogenia Luria Bertani (LB) (g/L) 10 NaCl, 10 triptona, 5 extracto de levadura en agua y pH 7,4 con NaOH.

Para la selección de clones bacterianos se utilizó LB-Agar (LB, 5g/L agar bacteriológico) con ampicilina a una concentración final de 100 μ g/mL.

3.1.2 Líneas celulares eucariotas

- Células Estromales Mesenquimales humanas de pulpa dentaria (MSC): Se obtuvieron mediante disgregación enzimática de la pulpa de terceros molares¹⁵³. Las MSC tienen la particularidad de presentar en superficie de membrana antígenos específicos como STRO-1⁺, CD46⁺ y ausencia de CD45. Estas células muestran capacidad de autorrenovación y formación de colonias.
- Células embrionarias de riñón humano 293 variante T (HEK 293T): Variante de la línea HEK 293 que contiene el antígeno T largo del virus SV40, permitiendo la replicación episomal de plásmidos con origen de replicación SV40.

3.1.2.1 Medios de cultivo eucariota

Las MSC fueron cultivadas en Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM) bajo en glucosa (1000mg/L) con piruvato (110mg/L) (Gibco, ThermoFisher Scientific).

Las células HEK 293T se cultivaron en DMEM alto en glucosa (4500mg/L) con L-Glutamina (584mg/L) (Gibco, ThermoFisher Scientific).

Ambos medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por choque térmico (56°C durante 40 min) de Lonza y 1% penicilina/estreptomicina (P/S) (10000 U/mL) de Gibco. Para su expansión se utilizó tripsina-EDTA al 0,25% (Gibco). Las dos líneas se mantuvieron en incubadores HEPA CLASS 100 (Thermo Electron corporation) a 37°C y 5% de CO₂. Cuando se requirió cultivar las células en condiciones de hipoxia (1% O₂), se introdujeron durante 4h en una cámara Invivo2 400 Workstation de Ruskinn Technology.

3.2 Métodos de Genética Molecular

Durante la realización de este trabajo se han utilizado técnicas convencionales para la manipulación del material genético, con el fin de poder editarlo e introducirlo de manera estable en los cultivos de eucariotas.

3.2.1 Transformación bacteriana y obtención del plásmido purificado

Los plásmidos utilizados para la realización de este trabajo se transformaron en bacterias DH5 α ya que esta cepa bacteriana mejora el rendimiento de los plásmidos lentivirales. Para ello, sobre 100 μ L de bacteria se añadieron 200 ng de plásmido y se incubaron en hielo durante 20 min. Seguidamente, se realizó un choque térmico a 42°C durante 45 seg (tiempo crítico que determina el rendimiento del proceso) y se volvieron a incubar en hielo 2 min. A continuación, se añadió 1 mL del LB precalentado a 42°C para su posterior incubación en agitador orbital a 180 r.p.m

(revoluciones por minuto) durante 1h a 37°C. Transcurrido ese tiempo las muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m durante 1 min. El pellet se resuspendió en 50-100 µL de LB y se añadió sobre placas de LB Agar con ampicilina. Las placas se incubaron en una estufa a 37°C durante toda la noche con el fin de obtener colonias bacterianas.

3.2.2 Extracción y purificación de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico se partió de una colonia bacteriana que se inoculó en 3mL de LB con el antibiótico de selección y se incubó a 180 r.p.m y 37 °C hasta alcanzar la densidad óptica adecuada. Una vez crecido el cultivo se realizaron extracciones de ADN utilizando el kit Plasmid MiniPrep (GE Healthcare) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para la obtención de mayores cantidades de ADN, se inoculó una colonia bacteriana en matraces que contenían 200 mL de LB con el antibiótico de selección necesario, a continuación, se realizó la extracción de ADN con el kit Plasmid maxiprep (JETSTAR).

El ADN obtenido se cuantificó por espectrometría (NanoDrop ND1000) y las calidades de las muestras se corroboraron en función de los ratios 260/280 nm (~1,8 generalmente aceptado como ADN puro) y 230/260 nm (2,0-2,2, este rango de valores acepta una baja cantidad de contaminantes de la muestra con absorbancia a 230nm). Posteriormente el ADN se diluyó a una concentración de trabajo de 1µg/µL.

3.2.3 Inhibición química de la SUMOilación y detección de los sitios de unión de SUMO.

Para realizar estudios de SUMOilación y ver la implicación de esta modificación postraduccional, utilizamos el inhibidor de la SUMOilación ácido anacárdico (A.A) de Calbiochem, Merck Millipore. El A.A actúa de manera selectiva sobre la enzima E1 activadora de SUMO e interfiere en la formación del complejo intermedio E1-SUMO. La inhibición de la SUMOilación se realizó añadiendo 50 µM de A.A a los cultivos durante 4h.

Para la detección de los sitios susceptibles de SUMOilarse, utilizamos el programa SUMOplot (Abgent). Introdujimos la secuencia del dominio intracelular de Notch1

(NIICD) humano en el programa y se detectaron tres lisinas clave en sitios altamente susceptibles de ser SUMOilados (Tabla. 2)(Anexo I).

Posición en la proteína	Secuencia aminoacídica
K2049	AAVVL LKNG ANKDM
K2150	GYLGS LKPG VQGKK
K2252	HLNVA AKPE MAALG

Tabla. 2 Sitios susceptibles de SUMOilación de NIICD.

A continuación, se tradujeron a nucleótido las secuencias identificadas para poder así diseñar los oligonucleótidos necesarios para realizar la mutagénesis dirigida en el plásmido de sobreexpresión de NIICD (Tabla. 3).

Posición en el plásmido	Secuencia nucleotídica
868-869	gccgcagttgtgctcctg aa gaacggggctaacaagat atg
1171-1172	gcctacctgggcagcctc aa gccccggcgtgcagggcaa gaag
1477-1478	cacctgaacgtgcgccc aa gccccgagatggcggcgct gggt

Tabla. 3 Nucleótidos codificantes para las lisinas susceptibles de SUMOilación en la secuencia del plásmido EF.hICDN1.Ubc.GFP.

3.2.4 Generación de mutantes de NIICD

Una vez identificados los sitios susceptibles de SUMOilación se generaron mutantes de NIICD en los cuales se sustituyeron las lisinas descritas en la Tabla. 2 (a las que se une covalentemente la proteína SUMO) por prolinas.

Para generar los mutantes del plásmido EF.hICDN1.Ubc.GFP se utilizó el kit de mutagénesis dirigida QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit de Agilent.

En primer lugar, se diseñaron los cebadores para introducir las mutaciones concretadas en la secuencia desde OligoArchitect™ Primer and Probe Design (Sigma-Aldrich). Los cebadores diseñados se describen en las Tablas. 4 y 5.

Nombre	Tamaño(nt)	Tm °C	D.E a 68 °C	E.C.M
a868c_a869c	36	79,97	-52,55 kcal/mol	2,17%
	36	79,97	-51,61 kcal/mol	3,23%
a1171c_a1172c	28	81,00	-54,80 kcal/mol	2,84%
	28	81,00	-52,68 kcal/mol	4,09%
a1477c_1478c	28	79,54	-52,39 kcal/mol	2,97%
	28	79,54	-50,38 kcal/mol	4,26%

Tabla. 4 Descripción de los cebadores para las mutaciones. (nt: nucleótidos; Tm: temperatura media; D.E a 68°C: energía de dúplex a 68°C; E.C.M: coste energético de los desapareamientos)

Nombre	Secuencia del cebador
a8686c_a869c	D 5'-ctttgtagccccgttcggcaggagcacaactcggg-3'
	R 5'-ccgcagttgtgctcctgccgaacgggggctaacaag-3'
a1171c_a1172c	D 5'-ctgcacgccgggcccgggaggctgccagg-3'
	R 5'-cctgggcagcctcccggcggcgtgcag-3'
a1477c_1478c	D 5'-cgccatctcgggcccgggcccggcggcggc-3'
	R 5'-gaacgtggcggcccggcggcggcggcggc-3'

Tabla. 5 Secuencia de los cebadores para las mutaciones. (D: Directo; R: Reverso)

Posteriormente y siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de mutagénesis se realizaron las reacciones de mutagénesis dirigida. Para cada reacción se requirió de 10 ng de plásmido, 125 ng de cebador directo, 125 ng de cebador reverso, mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), reactivos de la reacción y enzima QuikChange Lightning. Una vez preparadas las reacciones, se realizaron las PCRs (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando para ello el termociclador Eppendorf (Mastercycler EP). Los parámetros que se utilizaron para programar la PCR se describen en la Tabla. 6.

Segmento	Ciclos	T °C	Tiempo
1	1	95	2min
2	18	95	20seg
		60	10seg
		68	7min
3	1	68	5min

Tabla. 6 Programa de PCR utilizado para introducir las mutaciones en la secuencia de NIICD.

A continuación, con el fin de obtener solo el producto de la reacción de mutagénesis y eliminar los restos de plásmido molde, se realizaron digestiones enzimáticas con DpnI ya que dicha enzima digiere el ADN metilado.

Una vez comprobada la calidad y cantidad de plásmido obtenido, y después de realizar las digestiones enzimáticas para comprobar el tamaño de los fragmentos, se llevó a cabo la transformación de bacterias XL10-GOLD ultracompetentes (Agilent) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.1. Una vez crecidas las bacterias, seleccionados diferentes clones y después de realizar la extracción y purificación del ADN, se secuenciaron los fragmentos de interés para comprobar si las mutaciones se habían insertado correctamente.

Una vez verificadas las secuencias, se transformaron los clones seleccionados en bacterias DH5 α y se inocularon en medio LB para la posterior extracción de ADN plasmídico.

3.2.5 Digestiones enzimáticas

Las digestiones enzimáticas se realizaron para comprobar la integridad del plásmido tras introducir las mutaciones diseñadas. Para ello se utilizaron las enzimas descritas en la Tabla. 7.

Enzima	Tamaño fragmentos generados (pb)
EcoRI	6427/8500
HindIII	914/1470/2054/2645/3967/7669/8512/9714

Tabla. 7 Enzimas utilizadas para las digestiones del plásmido EF.hICDN1.Ubc.GFP.

Para llevar a cabo la digestión, se mezclaron 200 ng de plásmido con la enzima de restricción seleccionada (10 Unidades), su tampón correspondiente (5µL) y H₂O (43 µL). Las muestras se incubaron entre 1 y 2 h a 37°C.

El patrón de digestión obtenido de cada una de las muestras se comprobó en un gel al 0,8% de agarosa (Bio-Rad) en tampón tris-acetato EDTA (TAE): 40mM Tris-acetato (Sigma-Aldrich), 1mM Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma-Aldrich) y pH ajustado a 8,3. Para visualizar las bandas el gel se incubó con GelRed (Biotium) durante 40min a 60 r.p.m en oscuridad y se reveló con el sistema Gel Doc XR de Bio-Rad.

3.2.6 Transducción lentiviral

3.2.6.1 Transducción de MSCs con los vectores lentivirales.

Para la expresión de las diferentes proteínas en líneas celulares se generaron líneas estables de MSC que expresaban los vectores pWPI-GFP, pWPI-HIF-1 α -GFP, EF.GFP, EF.hICDN1.Ubc.GFP y las variantes mutadas. Para ello, se utilizaron células HEK 293T como línea empaquetadora. El proceso de generación de virus e infección se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Día 1: Se sembraron 3 placas de 100 cm² (p100) de HEK 293T (6x10⁶ células/p100) por cada placa de 100 cm² de MSC a infectar.
- Día 2: Se llevó a cabo la transfección de los plásmidos. Una hora antes de comenzar, el medio de cultivo se reemplazó por medio DMEM alto en glucosa suplementado con 1% P/S y 25 µM de cloroquina. En paralelo se prepararon las siguientes soluciones:
 - Solución A (µL/p100, *stock* de los vectores 1µg/µL): 5 µL de vector de sobreexpresión, 3 µL de vector PAX2, 1,5 µL de vector VSV, 62 µL de CaCl₂ 2M, y 428,5 µL de agua miliQ filtrada.
 - Solución B: 500 µL HBS 2x (en mM: 280 NaCl, 50 HEPES, 1,5 Na₂HPO₄ (todos los reactivos de Sigma-Aldrich), pH 7 con NaOH y filtrado con filtros de 0,22 µm (Merck Millipore).

Para producir el empaquetamiento de los virus en las células HEK 293T se utilizaron los vectores psPAX2 y pVSV (Addgene). psPAX2 o plásmido empaquetador contiene los genes necesarios para el empaquetamiento del ARN en la partícula viral (*gag*) y la transcripción reversa e integración en el genoma celular (*pol*). El vector pVSV o vector de envuelta contiene el gen (*env*) necesario para la formación de la cubierta del virus, así como para la fusión con las células.

A continuación, la solución A se añadió gota a gota sobre la solución B (1:1) mientras la mezcla se agitaba en un vórtex. Una vez realizada la mezcla, ésta se añadió a cada p100 de HEK 293T previamente sembrada. Transcurridas 8h se cambió el medio y se reemplazó por el medio específico de las células que se fueran a infectar, en este caso de MSC, suplementado con 1% P/S y sin FBS.

- Día 4: Transcurridas 48h, recolectamos el medio de las HEK 293T en falcons de 50 mL y centrifugamos a 2000 r.p.m durante 5min a temperatura ambiente. A continuación, se filtraron los sobrenadantes con filtros de 0,45 μm y el filtrado se traspasó a falcons concentradores *Vivaspin 20 centrifugal concentrator* (Sartorius). Los sobrenadantes con las partículas virales fueron centrifugados a 3.000g durante 30min a temperatura ambiente y una vez concentrados (hasta quedar menos de 1mL de volumen), se lavaron con 10mL de PBS (tampón fosfato salino) frío y se volvió a centrifugar 3000xg durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez concentrado el sobrenadante de nuevo, se igualaron los volúmenes de cada tubo concentrador con PBS frío y fueron transferidos a tubos para ultracentrífuga PA Ultracone de 3,5 mL (Fisher Scientific). Posteriormente, se centrifugaron a 28000 r.p.m durante 1h 30 min a 4 °C en ultracentrífuga Optima TLX de Beckman con rotor TLS.55. Transcurrido ese tiempo, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 μL de PBS.

Una vez estuvieron concentrados los virus, el medio de las células MSC que se habían sembrado el día anterior fue retirado y sustituido por 4-5 mL del medio correspondiente suplementado con un 1% P/S, sin FBS, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de polibreno y el volumen determinado del concentrado viral. Transcurridas 8h desde la infección, se cambió el medio por medio de MSC completo.

Una vez transcurridas 48-72h tras las infecciones, la eficiencia de la infección se comprobó mediante citometría de flujo ya que los plásmidos correspondientes contienen la proteína fluorescente verde GFP.

El plásmido pWPI-GFP fue adquirido de Addgene mientras que el plásmido pWPI-HIF-1 α -GFP fue generado en el laboratorio¹⁵⁴ y se clonó HIF-1 α entre los sitios de restricción SawI y PacI del vector pWPI-GFP. Los vectores EF.GFP y EF.hICDN1.Ubc.GFP fueron adquiridos de Addgene, mientras que las variantes mutadas se generaron mediante mutagénesis dirigida en el laboratorio.

3.2.6.2 Infección de HEK 293T con los vectores lentivirales.

Para generar líneas estables de HEK 293T con los vectores EF.GFP, EF.hICDN1.Ubc.GFP y los mutantes de este último, se realizó el mismo procedimiento utilizado en el apartado anterior salvo que a estas células se les añadió directamente el concentrado obtenido de los tubos concentradores Vivaspin 20.

Una vez transcurridas 48-72h tras las infecciones, la eficiencia se comprobó también mediante citometría de flujo por detección de la fluorescencia emitida por excitación de la proteína GFP.

3.3 Métodos de Biología Molecular

3.3.1 Extracción de ARN y cuantificación

Los cultivos celulares se lavaron con PBS y a continuación se lisaron con tampón RLT (tampón de lisis celular y tisular para la extracción de material genético) suplementado con β -mercaptoetanol (10 μ L/mL). Para la extracción de ARN total se utilizó el kit RNeasyPlus Mini Kit (Qiagen).

Las muestras de ARN se cuantificaron por espectrometría (NanoDrop ND1000) y las calidades de las mismas se corroboraron en función de los ratios 260/280 nm (2,0 generalmente aceptado como ARN puro) y 230/260 nm (2,0-2,2, este rango de valores acepta una baja cantidad de contaminantes de la muestra con absorbancia a 230nm).

3.3.2 Generación de ADN copia por retrotranscripción

La síntesis de ADNc se llevó a cabo mediante retrotranscripción usando el kit de transcripción reversa de gran capacidad (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La concentración de RNA utilizada en todos los casos fue de 1 µg. La retrotranscripción se llevó a cabo en termociclador eppendorf y con los ciclos de temperatura que se describen en la Tabla. 8.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	25 °C	10 min
2	2	37 °C	60 min
3	1	85 °C	5 min
4	-	4 °C	∞

Tabla. 8 Programa para la retrotranscripción utilizado en las muestras para generar ADNc desde ARN.

3.3.3 Cuantificación relativa de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real

Para la realización de la RTqPCR se utilizaron las muestras de ADNc obtenidas en la retrotranscripción diluidas 1:10 en agua libre de RNAsas y DNAsas (Thermo Fisher). Para la realización de este trabajo se analizaron los genes descritos en la Tabla. 9.

GEN	Secuencia del cebador
ACTB	D 5'-AGAGCCTCGCCTTTGCCGATCC-3' R 5'-CATGCCGGAGCGTTGTCGAC-3'
HIF-1α	D 5'-TGGAAGGTATTGCACTGCAC-3' R 5'-ATTTGATGGGTGAGGAATGG-3'
Hes1	D 5'-AAGAAAGATAGCTCGCGGA-3' R 5'-TACTTCCCCAGCACACTTGG-3'
Hey1	D 5'-AGGTAATGGAGCAAGGATCTGC-3' R 5'-CCCGAAATCCCAAACCTCCGA-3'
Hey2	D 5'-GGATTATAGAGAAAAGGCGTC-3' R 5'-GTTTTCAAAGCAGTTGGC-3'

Tabla. 9 Secuencias de los cebadores utilizados en la RTqPCR. ACTB (Actina, gen referencia de expresión constitutiva) (D: Directo; R: Reverso)

La RTqPCR se llevó a cabo utilizando SYBR Green I (1X LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche)) en el termociclador a tiempo real LightCycler 480 Instrument (Roche). Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniendo los incrementos relativos de cada gen de interés con respecto al gen de control interno ACTB y utilizando como control GFP-MSC en el caso de las MSC y GFP-293T en el caso de las HEK 293T.

3.4 Métodos Bioquímicos

3.4.1 Extracción proteica

Las células fueron lisadas a 4°C en tampón RIPA1x (RIPA 10x: 1,5M NaCl, 10% Nonidet P40 (NP-40), 0,5M Tris HCl, 5% Deoxicolato sódico (DOC), 1% Dodecilsulfato sódico (SDS), pH 8) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, PhoStop phosphatase inhibitor cocktail ambos de Roche). El resto de reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Tras una incubación de 15 min en hielo durante la cual se realizó vórtex cada 5 min, los lisados se centrifugaron a 16.000xg durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un eppendorf para la posterior cuantificación proteica.

3.4.2 Cuantificación proteica

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Este método combina la reacción de las proteínas que contienen Cu^{+2} en un medio alcalino produciendo Cu^+ con el ácido bicinconínico (BCA), altamente sensible y selectivo para este catión. Al combinarse el Cu^+ con el BCA se produce coloración púrpura en las muestras, coloración cuya intensidad dependerá de la concentración de proteínas. Esta reacción exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm permitiendo su cuantificación por espectrofotometría.

Para la cuantificación de las proteínas se prepararon las siguientes soluciones:

- Combinación 50:1 de la solución A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en solución de NaOH) y solución B (sulfato de cobre al 4%).
- La recta patrón utilizada para la cuantificación se describe en la Tabla. 10:

Concentración de BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	V (μL) de BSA (2 mg/mL)	V (μL)de tampón de lisis
0	0	30,0
25	0,375	29,62
125	1,87	28,12
250	3,75	26,25
500	7,5	22,5
750	11,25	18,75
1000	15,0	15,0
1500	22,5	7,5
2000	30,0	0

Tabla. 10 Recta patrón de BSA utilizada para la cuantificación proteica de las muestras.

La mezcla se incubó con la muestra durante 30 min a 37°C y los valores se leyeron en un espectrofotómetro VICTOR X5 de PerkinElmer.

Para la transformación de datos de absorbancia a cantidad de proteínas en las muestras se utiliza la ecuación lineal de la recta:

$$y = m \cdot x + b$$

$$m = \Delta y / \Delta x = (y_1 - y_0) / (x_1 - x_0)$$

Siendo:

- y: el valor de ordenadas (absorbancia)
- m: el valor de la pendiente
- x: el valor de las abscisas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
- b: el valor donde la recta corta el eje de las ordenadas

3.4.3 Preparación de las muestras para electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida

A lo largo de la tesis hemos utilizado $40\mu\text{g}$ de proteína para realizar los *Western Blots*. A las muestras se les añadió tampón de carga Laemmli Sample Buffer 4x Bio-Rad suplementado con β -mercaptoetanol siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez preparadas las muestras se calentaron en un termo bloque a 95°C durante 15min y posteriormente se sometieron a una centrifugación corta.

3.4.4 *Western blot*

El *Western blot* es la técnica mediante la cual separamos (electroforesis en gel de poliacrilamida); transferimos (transferencia húmeda) e identificamos proteínas (incubación con anticuerpos y revelado).

3.4.4.1 Electroforesis desnaturizante y reductora

Del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) es un tipo de electroforesis desnaturizante. El beta-Mercaptoetanol se encarga de destruir los puentes disulfuro y el detergente SDS desnaturiza y aporta

carga negativa neta a cada cadena polipeptídica separada. El SDS está presente tanto en las muestras como en el tampón de electroforesis a lo largo de todo el procedimiento. Al obtener cadenas con carga negativa, la separación de proteínas se realiza en función de su masa molecular.

El gel está formado por acrilamida y bisacrilamida, que polimerizan linealmente y en ramificaciones respectivamente, obteniéndose una matriz cuyo poro dependerá de la concentración final de estos compuestos

Se trata de una electroforesis discontinua ya que utiliza dos geles, uno concentrador con bajo nivel de entramado y pH 6,8 y un gel separador con pH 8,8. Los geles utilizados a lo largo de esta tesis se describen en las Tablas. 11 y 12.

Gel concentrador:

GEL CONCENTRADOR 5%	V para un gel (5mL)
Agua MiliQ	72 %
Tris HCl 0,5M pH 6,8	12,52 %
Acrilamida/Bisacrilamida 40% (*)	12,52 %
SDS 10%	1 %
APS 10%	1 %
TEMED	0,04 %

Tabla.11 Gel concentrador de poliacrilamida al 5%. (*) Bio-Rad; TEMED: Tetrametiletilendiamina; APS: Persulfato amónico, Sigma-Aldrich

Geles separadores:

GEL 10%	V para un gel (10mL)
Agua MiliQ	48 %
Tris HCl 1,5M pH 8,8	25 %
Acrilamida/Bisacrilamida 40% (*)	25 %
SDS 10%	1 %
APS 10%	1 %
TEMED	0,04 %

GEL 7,5%	V para un gel (10mL)
Agua MiliQ	54,3 %
Tris HCl 1,5M pH 8,8	25 %
Acrilamida/Bisacrilamida 40% (*)	18,7 %
SDS 10%	1%
APS 10%	1 %
TEMED	0,04 %

Tabla.12 Geles separadores de poliacrilamida (10% y 7,5%). (*) Bio-Rad; TEMED: Tetrametiletilendiamina; APS: Persulfato amónico, Sigma.

Para identificar el tamaño de las proteínas utilizamos un patrón de pesos moleculares estandarizados (Prestained Protein Standards Dual Color Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo en cubetas para electroforesis (Bio-Rad) con tampón electroforético 1x (25mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS). Se aplicó corriente continua de 100-120V con una fuente Power Pac Basic de Bio-Rad.

3.4.4.2 Transferencia húmeda

La transferencia húmeda es la técnica que utilizamos para transferir las proteínas separadas en la SDS-PAGE a una membrana de alta afinidad para posteriormente identificarlas mediante el uso de anticuerpos. En esta tesis hemos utilizado

membranas de polivinildifluoruro (PVDF) con poro de 0,45 μm (ThermoFisher Scientific) debido a su alta capacidad de adsorción proteica.

La transferencia húmeda se llevó a cabo en cubetas para transferencia (Bio-Rad) con tampón de transferencia 1x (7:2:1 de agua, etanol y tampón de transferencia 10x respectivamente (0,25 M Trizma base, 2M glicina en agua). Se aplicó una corriente continua de 100-120V con una fuente Power Pac Basic de Bio-Rad. Los tiempos de transferencia fueron diferentes en función del tamaño y abundancia de las proteínas en estudio (desde 2 h hasta toda la noche).

3.4.4.3 Bloqueo de membrana, incubación con anticuerpos y revelado

Las membranas fueron bloqueadas con tampón tris salino (TBS: 50mM Tris-Cl, 150mM NaCl, pH 7,6) y un 5% de leche desnatada en polvo o BSA (tampón de bloqueo) dependiendo de las especificidades de cada anticuerpo. El bloqueo se realizó en agitación durante 1h a temperatura ambiente. Tras el bloqueo las membranas fueron incubadas con anticuerpo primario en tampón bloqueo y TBS (1:1) (solución de anticuerpo) durante toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron en agitación y a temperatura ambiente con TBS-0,1% Tween 20 (un lavado de 10 min) y TBS (dos lavados de 5min) A continuación, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (HRP) en solución de anticuerpo durante 1h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados iguales al procedimiento anterior y se procedió a revelar. La señal fue detectada utilizando Amersham ECL Western Blot Detection (GE Healthcare). Las membranas se revelaron en la reveladora AGFA Curix 60 o mediante revelado digitalizado en Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

3.4.4.4 Anticuerpos utilizados en los *Western Blots*

Los anticuerpos utilizados para la realización de este trabajo se muestran en la Tabla.13

Anticuerpo	Dilución	Especie	Incubación	Casa comercial	Stock (µg/mL)
αTubulina	1:4000	Ratón	4°C o.n	Sigma-Aldrich	1000
α-NIICD	1:1000	Ratón	4°C o.n	Santa Cruz	100
α-NIICD	1:1000	Conejo	4°C o.n	CST	990
α-Jagged1	1:1000	Conejo	4°C o.n	CST	78
α-Jagged2	1:1000	Conejo	4°C o.n	CST	153
α-Dll1	1:1000	Conejo	4°C o.n	CST	170
α-Dll3	1:1000	Conejo	4°C o.n	CST	87
α-Dll4	1:1000	Conejo	4°C o.n	CST	77.5
α-HIF1α	1:1000	Ratón	4°C o.n	BD	250
α-SUMO1	1:500	Conejo	4°C o.n	CST	26
α-GAPDH	1:1000	Conejo	4°C o.n	Sigma-Aldrich	1000
α-Histona3	1:500	Ratón	4°C o.n	Abcam	100
α-Conejo HRP	1:3000	Cabra	1h RT	Sigma-Aldrich	800
α-Ratón HRP	1:10000	Cabra	1h RT	Sigma-Aldrich	800

Tabla. 13. Listado de anticuerpos utilizados en WB. RT: Temperatura ambiente; o.n: toda la noche (CST: Cell Signaling Technology; BD: Becton Dickinson Unit)

3.4.5 Inmunoprecipitación

La IP es una técnica utilizada para asilar y concentrar una proteína concreta en una muestra a través del uso de anticuerpos específicos contra ella.

Para llevar a cabo la IP se siguió el protocolo cedido por el laboratorio del Dr José Luis de la Pompa del Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas (CNIC). Se utilizó resina de agarosa poli A/G Plus (Santa Cruz). Antes de comenzar el protocolo, se lavó la misma 3 veces con TBS frío y se centrifugó a 8.000xg durante 30 seg a 4°C. A continuación, se dejó reposar en hielo durante 1 min y se bloqueó con una solución de TBS al 1% albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) durante 1h a

temperatura ambiente y movimiento. Transcurrido el tiempo de bloqueo, la resina se lavó dos veces como se describe anteriormente y se conservó a 4°C.

Las células se lisaron a 4°C con tampón de lisis para IP (50 mM de Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 0,5% de N-P40, 0,5% de DOC, 0,05% de SDS, junto con los inhibidores de proteasas y fosfatasas, 10µM MG132 (Calbiochem) y 20Mm N-etilmaleimida (NEM) de Sigma-Aldrich). Los lisados se recogieron en tubos eppendorf previamente enfriados y se incubaron en hielo durante 20 minutos, a continuación, se centrifugaron a 14.000xg durante 8 min a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos eppendorf limpios previamente enfriados y fueron cuantificados mediante BCA.

Para evitar inespecificidades, las muestras fueron incubadas durante 1h a 4°C en movimiento con la resina de agarosa previamente lavada y bloqueada. A continuación, las muestras ya bloqueadas se centrifugaron a 8.000xg durante 30 seg a 4°C y se transfirieron a tubos eppendorfs limpios previamente enfriados.

El siguiente paso fue conjugar el anticuerpo anti-N1ICD (Cell Signaling Technology) a las resinas poli A/G. Para ello, el anticuerpo se añadió a una concentración 1:200 a los tubos preparados con resina. Las resinas fueron incubadas con el anticuerpo durante toda la noche a 4°C en movimiento. Posteriormente, se lavaron para eliminar el exceso de anticuerpo y acto seguido se incubaron las muestras proteicas con las resinas conjugadas al anticuerpo durante 2-3h a 4°C y en noria. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron a 8.000xg durante 30seg a 4°C y se dejaron reposar 1min en hielo. Tras eliminar el sobrenadante y lavar la resina 5 veces, se añadió Laemmli 2x y se calentó a 95°C durante 10 min para desprender las proteínas de la resina. A continuación, se centrifugaron de nuevo las muestras para transferir el sobrenadante a tubos limpios.

Las muestras se resolvieron en SDS-PAGE seguido de inmunoblot.

3.5 Métodos de Biología Celular

3.5.1 Fraccionamiento celular

Esta técnica se realizó con la finalidad de estudiar la distribución a nivel celular de N1ICD separando las fracciones de citoplasma y núcleo.

Las células se levantaron cuidadosamente a 4°C con tampón de fraccionamiento subcelular (SF) compuesto por 250 mM de Sacarosa, 20 mM de HEPES pH 7,4, 10 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 1 mM de Ácido etilenglicol bis (amino-etil éter) N' tetra acético (EGTA), 1 mM de Ditiotretitol (DTT) (todos los compuestos de Sigma-Aldrich) e inhibidores de proteasas.

A continuación, se agitaron a 4°C durante 30 min en agitador de rodillos a 30-50 r.p.m. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron 10 aspiraciones con jeringa de 30G. Posteriormente, se tomaron pequeñas alícuotas de 5µL que se observaron en el microscopio para comprobar si las células habían expulsado el núcleo. En los casos en los que no se observó dicho proceso, se repitieron los pases por jeringa hasta observar la separación nuclear. Una vez asegurada la expulsión del núcleo, se realizó una centrifugación a 720xg durante 5 min a 4°C y se separaron el precipitado (que correspondía con la fracción nuclear) y el sobrenadante (fracción citosólica). La fracción nuclear se lavó con tampón SF tres veces centrifugando a 1.000xg durante 10min a 4°C para limpiarla y posteriormente se procedió a su lisis con tampón de Lisis Nuclear (NL) (50 mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 1% N-P40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 10% Glicerol, inhibidor de proteasas y fosfatasa). La fracción nuclear obtenida se trató de nuevo en agitador de rodillos a 4°C durante 15min y finalmente se centrifugó a 1.000xg durante 10min a 4°C para precipitar las membranas y obtener así la fracción soluble de proteínas nucleares ¹⁵⁵.

La fracción citosólica se centrifugó a 10.000xg durante 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante desechando así los restos de membranas.

Las muestras se resolvieron por SDS-PAGE utilizando el anticuerpo α -Histona3 como control de carga y calidad del fraccionamiento en la fracción nuclear y α -GAPDH para la fracción citosólica (anticuerpos mostrados en la Tabla. 13).

3.5.2 Inmunofluorescencia

Las células se sembraron sobre cristales de 18 mm de diámetro (Carolina Biological Supply Company). Una vez estabilizado el cultivo, se lavaron dos veces con PBS frío, inmediatamente se fijaron con etanol 70% frío durante 10min a 4°C. A continuación, se lavaron 2 veces con PBS frío y se bloquearon con solución de bloqueo-permeabilizante (10% suero de cabra neonata (NGS) Gibco y 0,01% Triton-X100 (Pronadisa) en PBS) durante 1h a 37°C. Tras el bloqueo, las células fueron incubadas

con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo y PBS (1:1) (solución de anticuerpo) durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el periodo de incubación, se realizaron 5 lavados de 5min en agitación con PBS frío y se incubaron con anticuerpo secundario (AlexaFluor 555) durante 1h a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se realizaron 5 lavados de 5min con PBS frío y las células se incubaron durante 10 min con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a 4°C. Para finalizar, se realizaron 5 lavados de 5min con PBS frío y los cristales se montaron sobre portaobjetos con FluorSave (Merck Millipore) y cubreobjetos.

3.5.2.1 Anticuerpos utilizados en las inmunofluorescencias

Los anticuerpos utilizados en las inmunofluorescencias se resumen en la tabla 14:

Anticuerpo	Dilución	Especie	Tiempo de incubación	Casa comercial	Stock (µg/mL)
α-N1ICD	1:200	Conejo	4°C o.n	Abcam	100
α-HIF1α	1:200	Ratón	4°C o.n	Abcam	50
α-BrdU	1:100	Rata	4°C o.n	Abcam	50
AlexaFluor 555	1:1000	Conejo	1h RT	Invitrogen	100
AlexaFluor 647	1:1000	Ratón	1h RT	Invitrogen	100
AlexaFluor 555	1:1000	Rata	1h RT	Invitrogen	100

Tabla. 14. Listado de anticuerpos utilizados en IF. o.n: toda la noche RT: Temperatura ambiente.

3.5.2.2 Obtención y análisis de las imágenes

La adquisición de imágenes mediante microscopia confocal se llevó a cabo en el Servicio de microscopía confocal del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio (invertido) láser confocal Leica, modelo TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems) usando objetivo de inmersión de 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A. Todas las imágenes fueron adquiridas bajo las mismas condiciones y los análisis de distribución de fluorescencia fueron utilizadas con el programa ImageJ.

3.5.3 Cuantificación de la translocación nuclear de N1ICD mediante ensayo de InCell

El ensayo de InCell se llevó a cabo para cuantificar la translocación de N1ICD en la Unidad de Citómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Para ello se sembraron las células en placas de 24 pocillos y se realizó inmunofluorescencia como se describe en el apartado anterior. Los anticuerpos utilizados para marcar N1ICD se describen en la Tabla. 13. (α -N1ICD, AlexaFluor555 y DAPI).

Las imágenes se adquirieron con el microscopio de epifluorescencia InCell Analyzer 1000 (GE Healthcare) utilizando objetivo 20x.

Se adquirieron 15 campos de cada pocillo y el análisis se realizó a través del programa InCell Analyzer 1000 Workstation. Las células se definieron utilizando fragmentación nuclear basada en el marcaje DAPI y la señal AlexaFluor555 (rojo) se utilizó para definir la localización de N1ICD en la célula.

3.5.4 Ensayo de proliferación por incorporación de bromodesoxiuridina

El BrdU es un nucleótido sintético análogo de la timidina, capaz de incorporarse en el ADN en replicación y de ser detectado mediante el uso de anticuerpos, por lo que es una técnica fácil y sencilla para detectar las células en fase de división y así calcular la tasa de proliferación celular.

Para realizar el ensayo las células se sembraron en cristales de 18mm. Transcurridas 24h, se añadió BrdU (Life Technologies) 10 μ g/mL durante 8h. A continuación, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con etanol frío al 70% durante 10min a 4°C. Los cristales se lavaron 3 veces con PBS y posteriormente fueron incubados con HCl 1N 30min a 37°C con el fin de desenmascarar la molécula de BrdU incorporada en la cadena de ADN de nueva síntesis. Para neutralizar la acción del ácido, las células se incubaron con tampón borato (mM: 100 Ácido bórico, 75 NaCl, 25 Tetraborato sódico en agua destilada y pH 8,4) 10min a temperatura ambiente. El resto de protocolo se realizó como se ha descrito en el apartado **3.3.7**.

Para cuantificar la tasa de proliferación se calcularon los porcentajes de división celular realizando contajes en campos aleatorios de 100 núcleos totales, considerando

células quiescentes los núcleos marcados con DAPI y en replicación o resultantes de división los núcleos marcados con AlexaFluor555.

3.5.5 Activación/Inhibición de la vía de Notch

La activación de la vía de Notch se produce en el momento en que uno de los ligandos del receptor Notch se une a este, permitiendo así el desencadenamiento de un proceso en cascada que finaliza con la escisión del dominio intracelular y su liberación en el citoplasma.

Para llevar a cabo la activación de la vía en nuestros cultivos se retiene el ligando Jagged1 sobre la superficie de las placas de cultivos (tapizado) y en esta superficie a posteriori se siembran las células. Para realizar el tapizado de las placas se siguieron los siguientes pasos:

- Incubación de las placas de cultivo con anti IgG-Fc humana de Jackson ImmunoResearch Laboratories (7,4 μ L/1,5 mL de PBS) durante 30 min a 37 °C.
- Dos lavados con PBS y bloqueo con DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de FBS durante 1h a 37 °C.
- Dos lavados con PBS e incubación con Jag1-Fc de R&D Systems (8,1 μ L/1,5 mL de PBS) durante 2h a 37 °C.

A continuación, las células se sembraron a una confluencia del 60% para asegurar la activación de la vía por el tratamiento y no por contacto célula-célula. Las células estuvieron sembradas sobre Jagged1 exógeno durante 24h para asegurar la activación.

La inhibición de la vía de Notch se realizó mediante el uso de RO4929097 (RO) de Xcess Bioscience a una concentración de 10 μ M durante 48h. RO inhibe de manera específica la enzima γ -secretasa, enzima encargada de la última escisión del dominio intracelular de Notch, generando así el dominio libre que actúa como factor transcripcional. Bloqueando esta última escisión la vía de Notch no es activa.

3.6 Métodos funcionales

3.6.1 Ensayo de cicatrización *in vitro*

Para llevar a cabo estudios de migración celular realizamos la técnica de cicatrización *in vitro*. Para ello las células se sembraron en placas de 12 pocillos al 100% de confluencia con la intención de formar una monocapa. A continuación, con una punta fina p10 de pipeta se realizaron rayas en el centro de los pocillos con el fin de mimetizar una herida. Tras dos lavados con PBS para eliminar los restos celulares levantados las células se cultivaron con su medio de cultivo correspondiente. El cierre de la herida se monitorizó utilizando microscopia *time lapse* en microscopio Leica DMI6000 automatizado. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el programa ImageJ.

3.6.2 Ensayo de migración mediante cestillo

Mediante el ensayo de cestillo lo que medimos fue la capacidad migratoria de las células. Para ello utilizamos placas cestillo de 24 pocillos de BD Falcon. Los pocillos de estas placas están formados por un pocillo convencional además de un soporte que forma otro pocillo separado del anterior por una membrana con poros de 8 μm .



1. Parte superior de la membrana
2. Parte inferior de la membrana

Las MSCs se sembraron en la parte superior de la membrana. Tras estabilizarse el cultivo durante la noche, se añadieron 25 ng/mL de IL-1 β en la parte inferior de la membrana. Como control positivo se añadió 10% FBS en la parte inferior de uno de los pocillos y como control negativo 0,5% de FBS. Transcurridas 8h las células no migradas en la parte superior de la membrana se eliminaron con una torunda de algodón, mientras que las células migradas presentes en la parte inferior de la membrana se fijaron con etanol 70% frío durante 10 min a 4°C. Posteriormente las membranas se tiñeron con DAPI, se recortaron y se montaron sobre portaobjetos con FluorSave y cubreobjetos. Se tomaron fotos con el microscopio de fluorescencia vertical Leica DM6000B a 40x y se contabilizaron los núcleos de las membranas.

3.7 Análisis estadísticos

Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (media \pm SD). Las comparaciones se llevaron a cabo utilizando *Student t-test*. Los valores estadísticos se calcularon utilizando el programa GraphPad Prism 6 y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un $P < 0,05$ en un intervalo de confianza del 95%.

4 RESULTADOS

4.1 La sobreexpresión de HIF-1 α induce cambios en la expresión génica y proteica de las MSCs

Con el objetivo de sobreexpresar de manera estable la proteína HIF-1 α , las células estromales mesenquimales humanas se transdujeron con los plásmidos lentivirales pWPI-GFP (MSC) o pWPI-HIF-1 α -GFP (HIF-MSC) (Fig. 10 A) tal y como se describe en ¹⁵⁴. Tras la infección, se comprobó mediante citometría de flujo que el porcentaje de células GFP positivas era superior al 95% (Fig. 10 B).

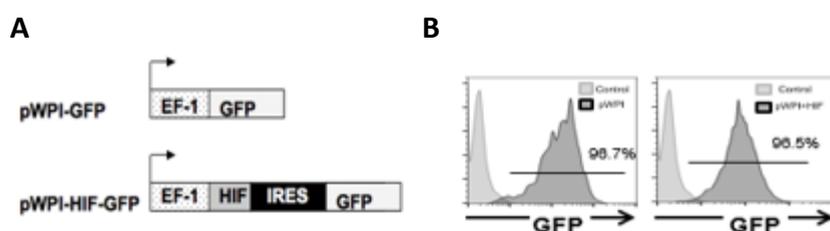


Figura 10. Transducción de las MSCs con vectores lentivirales conteniendo el gen de HIF-1 α . (A) Vectores lentivirales pWPI-GFP y pWPI-HIF-1 α -GFP. (B) Análisis por citometría de flujo para detectar las células GFP positivas en las MSC y HIF-MSC.

La tasa de sobreexpresión de HIF-1 α se confirmó también mediante análisis de RTqPCR. En la Fig.11 A, se muestra el incremento relativo de la expresión de HIF-1 α en los cultivos HIF-MSC respecto a los niveles detectados en MSC transducidas con el vector vacío. Los resultados se corroboraron por inmunoblot, en los que se detectó la expresión de la proteína HIF-1 α en los extractos celulares de HIF-MSC (Fig. 11 B). La densitometría de las membranas del inmunoblot reveló un incremento de la expresión en aproximadamente 4 veces (Fig. 11B).

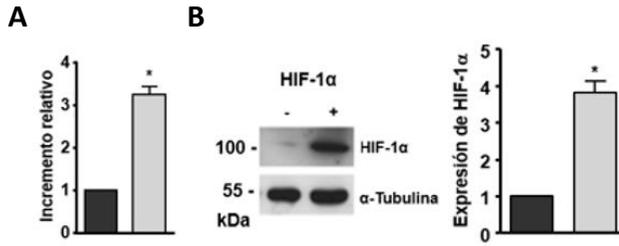


Figura 11. Cuantificación de la expresión de HIF-1 α en las MSCs. (A) Expresión de los niveles de RNA mensajero relativos de HIF-1 α detectados por RTqPCR en HIF-MSC (gris) en relación a MSC (negro). (B) Niveles de proteína HIF-1 α detectada por inmunoblot en HIF-MSC (gris) en relación a MSC (negro). Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. * p <0.05.

Por otra parte, se analizó la presencia de HIF-1 α en el núcleo de las células infectadas a través de imágenes obtenidas por microscopía confocal (Fig. 12 A y B).

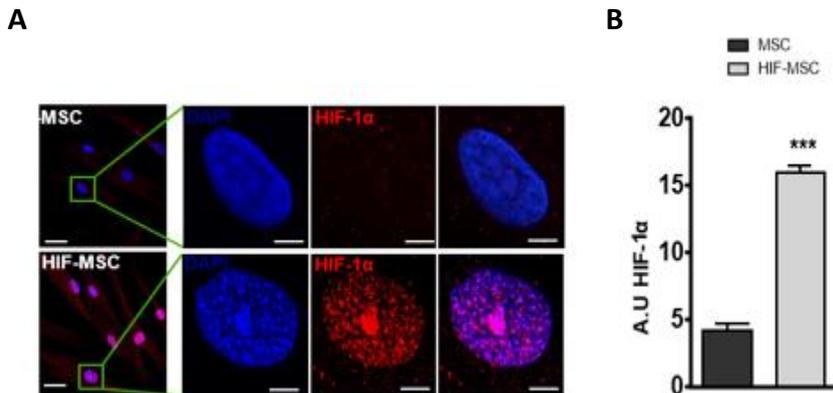


Figura 12. Localización nuclear de HIF-1 α en MSCs. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de MSCs y HIF-MSCs mostrando la localización nuclear de HIF-1 α . Barra de escala de los paneles superior e inferior izquierda: 30 μ m; resto de paneles 5 μ m. (B) Cuantificación de la fluorescencia de HIF-1 α en núcleo. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. *** p <0.001.

Uno de los procesos biológicos necesarios para que HIF-1 α ejerza su función una vez que el gen es transcrito y traducido a proteína en el citoplasma es su translocación al núcleo. Se quiso comprobar que este proceso no se veía afectado por la sobreexpresión de la proteína mediante transducción lentiviral. Como se observa en las imágenes y en la posterior cuantificación, la sobreexpresión de HIF-1 α permite la translocación al núcleo de la proteína HIF-1 α , lo que apunta a la funcionalidad de la proteína sobreexpresada.

4.2 La sobreexpresión de HIF-1 α en MSCs potencia la vía de señalización Notch

Se ha descrito que existe una interacción entre HIF-1 α y Notch, y este fenómeno ha sido verificado en diferentes líneas celulares tumorales como la C-33A (cérvix), HTC-116 (colon), U-87MG (glioma) y SKOV-3 (ovario) ^{114,156}. Esta interacción tiene como resultado el incremento del carácter metastático de dichas células debido a la potenciación de la vía de Notch en condiciones de hipoxia. Para conocer si este efecto también se producía en cultivos primarios de MSCs, se estudió la activación los componentes de la vía de Notch en los cultivos de MSCs y HIF-MSCs.

En primer lugar, se estudiaron los niveles relativos de ARN mensajero de los genes cuya transcripción ha sido activada por el factor transcripcional N1ICD como son Hes1, Hey1 y Hey2 (Fig. 13). Para ello, las células se sembraron en semi-confluencia, para evitar el fenómeno intrínseco de activación célula-célula. A continuación, se activó la vía de manera exógena mediante el tapizado de las placas de cultivo con el ligando Jagged1 (Jag) y utilizando el inhibidor RO4929097 (RO), específico de la vía, como control negativo.

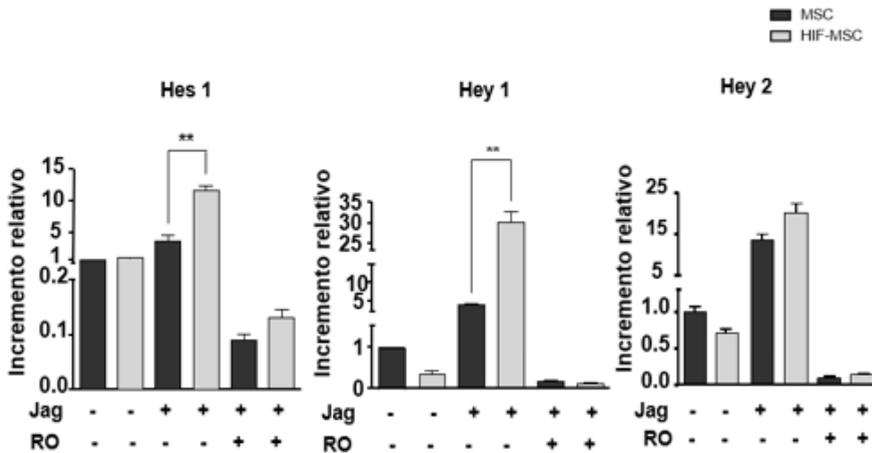


Figura 13. Análisis de la expresión de los genes regulados por Notch en células MSC y HIF-MSC con la vía de Notch activada. Análisis de qPCR de los genes Hes1, Hey1 y Hey2 en MSC y HIF-MSC cultivadas en presencia (+) o ausencia (-) de Jagged1 recombinante (Jag) y RO (inhibidor de la Y-secretasa) como control negativo. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. ** p <0.01.

Como se esperaba, se observó un incremento en los niveles de expresión de los genes diana de Notch tras la estimulación con Jag, tanto en células MSCs como en HIF-MSCs, siendo el incremento significativamente mayor en HIF-MSCs.

Los resultados sugieren que la estabilización de HIF-1 α ejerce un efecto potenciador de la vía de Notch una vez está activada por Jagged1.

4.3 HIF-1 α incrementa la expresión de ligandos funcionales de la vía de Notch en MSCs

Por otra parte, para evaluar en las MSCs la presencia o ausencia de ligandos activadores de la vía de Notch se analizó por electroforesis seguida de inmunoblot la expresión de los ligandos Jagged1, Jagged2, Dll1, Dll3 y Dll4 (Fig. 14 A). Los resultados mostraron la expresión diferencial de los ligandos, siendo significativamente mayor la presencia de éstos en células HIF-MSCs con respecto a MSC. Una vez detectados los ligandos de la vía de Notch y establecidas las diferencias entre ambas células, el objetivo fue comprobar si dichos ligandos eran funcionales y activaban la vía de Notch. Para ello, las células se sembraron en alta confluencia favoreciendo así el contacto ligando-receptor y se realizó de nuevo un análisis de RTqPCR para observar la expresión de los genes cuya expresión es regulada por Notch (Fig. 14 B). En dichas condiciones se observó que la expresión de Hes1 y Hey2, pero no de Hey1 fue significativamente mayor en HIF-MSCs con respecto a MSCs. Las diferencias observadas en la expresión génica a través de la activación con Jag o activación célula-célula podrían explicarse debido a la implicación de otros ligandos activadores de la vía además de Jagged1.

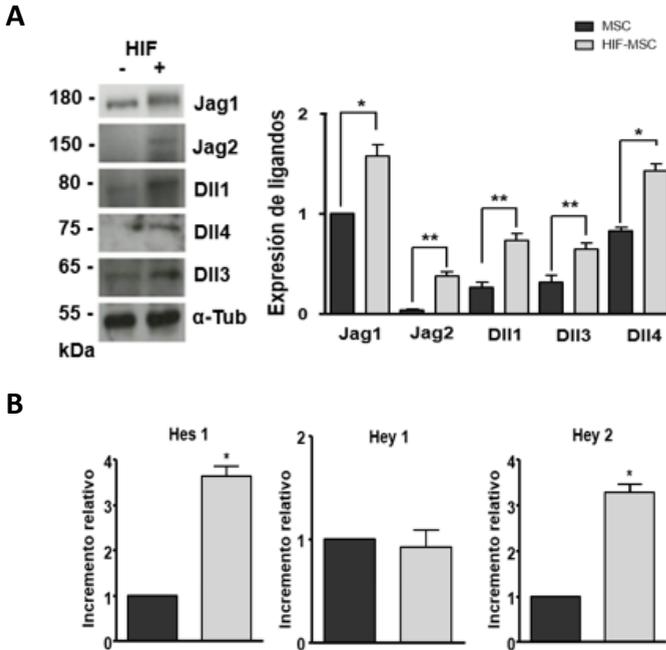


Figura 14. La expresión estable de HIF-1 α en MSCs incrementa la expresión de ligandos funcionales de la vía de Notch. (A) Imagen representativa de inmunoblot y cuantificación por densitometría donde se observan diferencias significativas en la expresión de los ligandos Jagged1, Jagged2, Dll1, Dll3 y Dll4 en HIF-MSCs con respecto a MSCs. (B) Análisis por qPCR de la expresión de Hes1, Hey1 y Hey2 resultado de la activación de la vía de Notch por ligando-receptor presentes en las células. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. * p <0.05 ** p <0.01.

Con los resultados obtenidos se concluyó que la sobreexpresión de HIF-1 α es capaz de incrementar la expresión de los ligandos de la vía de Notch, que a su vez éstos son funcionales como se deduce del aumento de la expresión de genes situados más abajo en la cascada de señalización de la vía de Notch. Además, cabe destacar el incremento significativo observado en la expresión de los genes diana de la vía de Notch en cultivos confluentes de HIF-MSCs con respecto a MSCs, demostrando de nuevo que HIF-1 α potencia la vía de Notch una vez ésta se encuentra activada.

4.4 Implicación de Notch en la migración de las células MSCs con expresión estable de HIF-1 α

En trabajos anteriores publicados por nuestro grupo se demostró que la sobreexpresión de HIF-1 α en MSCs derivadas de médula ósea estimulaba su capacidad migratoria y su tasa proliferativa ¹⁵⁴. Además, en otros trabajos se ha descrito también el papel de Notch tanto en la migración como en procesos de homeostasis y cancerosos ^{157,158}. Con estos antecedentes se decidió estudiar si Notch estaba también implicado en el proceso de migración de las MSCs.

Para ello llevamos a cabo ensayos de migración en dos dimensiones (2D), donde las células MSC y HIF-MSC fueron sembradas en monocapa para posteriormente realizar un ensayo de cicatrización. A continuación, se analizó en tiempo real el cierre de la herida generada tratando y sin tratar las células con RO para observar una posible implicación de la vía de Notch en el proceso. Con la realización del ensayo se observó que la sobreexpresión de HIF-1 α incrementaba de manera significativa la invasión. Cuando los cultivos de MSCs y HIF-MSCs fueron tratados con RO, se observó un bloqueo de la migración mediada por Notch, recuperando las tasas de migración observadas en las células HIF-MSCs a valores similares a los de las MSCs (Fig. 15).

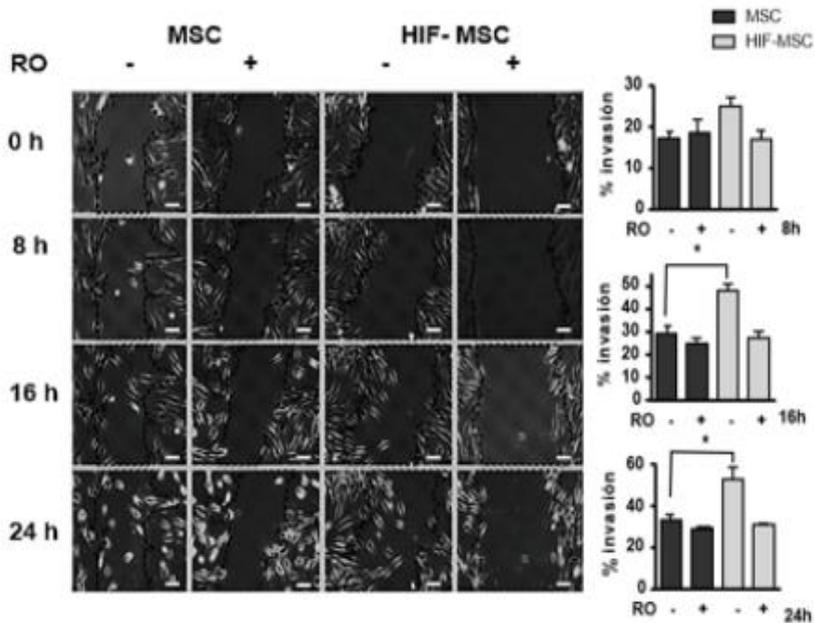


Figura 15. El incremento de la migración de las HIF-MSCs es dependiente de la vía de Notch activa. (A) Imágenes representativas de un ensayo de migración 2D mostrando la migración de las MSCs y HIF-MSCs en diferentes intervalos de tiempo en presencia o ausencia de RO. Las imágenes se tomaron con magnificación 100x. Las líneas punteadas definen el área rasgada. El porcentaje de la invasión se calculó a los tiempos indicados. Escala: 100 μ m. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. * p <0.05.

Otra forma de estudiar la capacidad migratoria de células en cultivo es estudiando su tropismo hacia un factor quimiotáctico separado de las células mediante una membrana porosa de forma que se establece un gradiente de concentración. Esta técnica se denomina comúnmente ensayo de cestillo ya que las células sembradas en la parte superior de la membrana deben migrar a través de los poros de la misma hacia la cámara inferior donde se coloca el factor quimiotáctico. En este ensayo las células MSC así como las HIF-MSC se cultivaron con un gradiente de IL-1 β (factor que induce migración en las MSCs) ¹⁵⁹ y en presencia o ausencia de RO, el inhibidor de la gamma-secretasa y por consiguiente de la acción de Notch (Fig. 16).

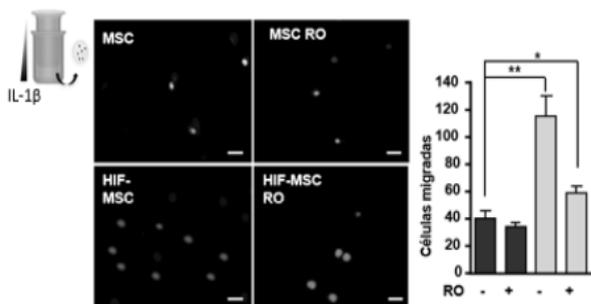


Figura 16. Migración inducida por la IL-1 β en presencia o ausencia de RO. Las células se sembraron en la parte superior de la membrana del cestillo, en la cámara inferior suplementamos el medio con 25 ng/ml de IL-1 β . Tras 8h, las células migradas a través de la membrana fueron marcadas con DAPI y contadas (MSCs barras negras, HIF-MSCs barras grises). Las imágenes se tomaron a una magnificación de 40x. Escala: 100 μ m. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. * p <0.05; ** p <0.01.

Los resultados obtenidos en los ensayos de migración fueron corroborados con los obtenidos en los ensayos de cestillo. El tratamiento con RO anuló las ventajas migratorias de las HIF-MSCs frente a las MSCs, señalando de nuevo la implicación de NICD en el proceso y la mediación de HIF-1 α .

4.5 La proliferación mediada por HIF-1 α de las MSCs es independiente de la vía de Notch

Para analizar la influencia de la señalización de Notch en la proliferación de las MSCs se llevó a cabo un ensayo de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU). Para asegurar la activación de la vía tanto las células MSC como las HIF-MSC se sembraron en cristales recubiertos con Jag1. El ensayo se llevó a cabo en presencia o ausencia del inhibidor RO y se contabilizaron las células positivas ya que correlacionan con la proliferación (Fig. 17). En concordancia con resultados previos previamente descritos con células de médula ósea¹⁵⁴, HIF-1 α incrementó también la tasa proliferativa de las MSCs. Sin embargo, este incremento significativo de la proliferación de las HIF-MSCs con respecto a las MSCs no se vio afectado con el tratamiento del inhibidor RO.

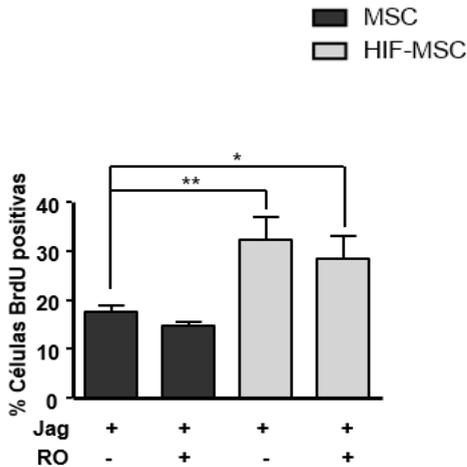


Figura 17. El incremento de la proliferación mediado por HIF-1 α en las MSCs es independiente de Notch. Las células MSCs y HIF-MSCs fueron tratadas con Jagged-1, con y sin RO y se cuantificó la proliferación en base a la incorporación de BrdU. Imágenes tomadas a magnificación 100x. Escala: 100 μ m. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. * p <0.05; ** p <0.01.

Los resultados obtenidos en el ensayo de BrdU, sugieren una inducción de la proliferación mediada por HIF-1 α , pero independiente de Notch debido a la ausencia de efecto de RO.

4.6 La proliferación de MSCs mediada por HIF-1 α es dependiente de SUMO

La cascada de señalización de la hipoxia requiere de un equilibrio muy finamente regulado entre la SUMOilación y la deSUMOilación, posiblemente a través de modificaciones postraduccionales de HIF-1 α ¹⁶⁰. Para estudiar la posible implicación de SUMO en la proliferación mediada por HIF-1 α en las MSCs se repitió el estudio de incorporación de BrdU utilizando ácido anacárdico (A.A) a 50 μ M, un reconocido inhibidor de la enzima E1 activadora de SUMO. (Fig. 18)

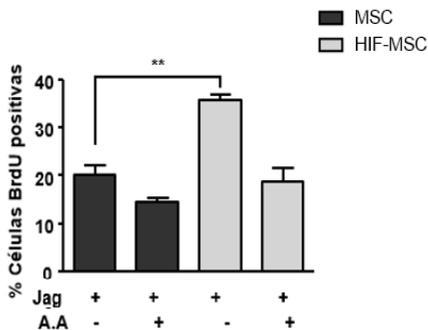


Figura 18. El incremento de la proliferación mediado por HIF-1 α en las MSCs es dependiente de SUMO. Las células MSCs y HIF-MSCs fueron tratadas con Jagged-1, con y sin A.A. Se cuantificó la proliferación en base a la incorporación de BrdU. Las imágenes tomadas a magnificación 100x. Escala: 100 μ m. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. * p <0.05; ** p <0.01.

Los resultados muestran un incremento significativo en la proliferación de HIF-MSCs con respecto a MSCs, sin embargo, el incremento de la tasa proliferativa mediado por la estabilización de HIF-1 α fue reducida por completo al tratar las células con A.A. Los resultados evidencian el papel clave de la modificación postraducciona SUMO en la proliferación de HIF-MSCs.

4.7 Las vías de señalización de HIF-1 α y Notch están relacionadas a través de la SUMOilación

Los resultados anteriores sugieren una posible interacción entre las vías de señalización HIF, Notch y SUMO. Para investigar esta posible interacción se analizó la influencia de SUMO en la expresión de los genes diana de la vía de Notch. Las células se sembraron en presencia o ausencia de Jag y A.A. El tratamiento con A.A en aquellas células con la vía de Notch previamente activada (Jag+) condujo a una disminución en los niveles de expresión de Hes1, Hey1 y Hey2, encontrado solo resultados significativamente diferentes en las células HIF-MSC (Fig. 19).

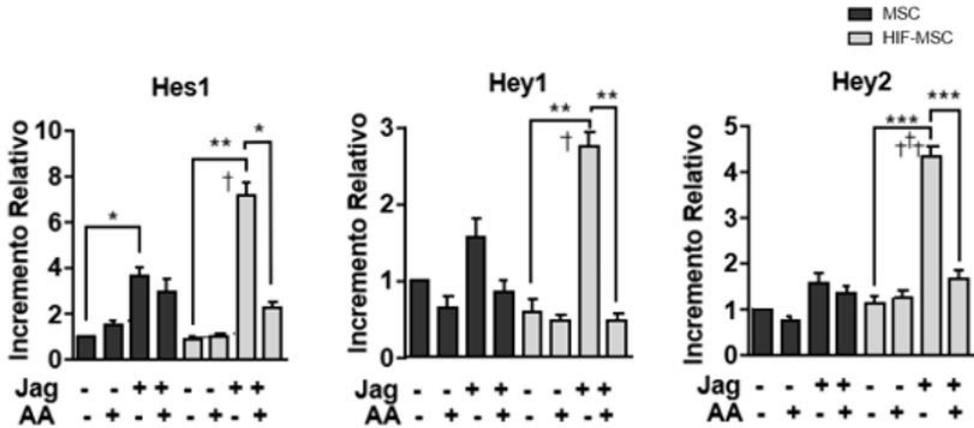


Figura. 19 HIF-1 α potencia la vía de Notch en MSCs a través de la SUMOilación. Análisis por RTqPCR de los genes diana de Notch (Hes1, Hey1 y Hey2) en MSC y HIF-MSCs tratadas en presencia (+) o ausencia (-) de Jagged1 (Jag) y A.A. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. * p <0.05; ** p < 0.01, *** p <0.001, † p <0.05, †† p <0.001. † indica significancia entre HIF-MSCs *versus* MSC en presencia de Jagged 1 (Jag+).

Para corroborar la implicación de SUMO1 en las funciones biológicas observadas en HIF-MSC se realizaron estudios de inmunoprecipitación de dicha proteína. Los niveles globales de SUMO1 fueron más altos en las HIF-MSC con respecto a las MSC, según los resultados obtenidos por densitometría de imagen en inmunoblot (Fig. 20).

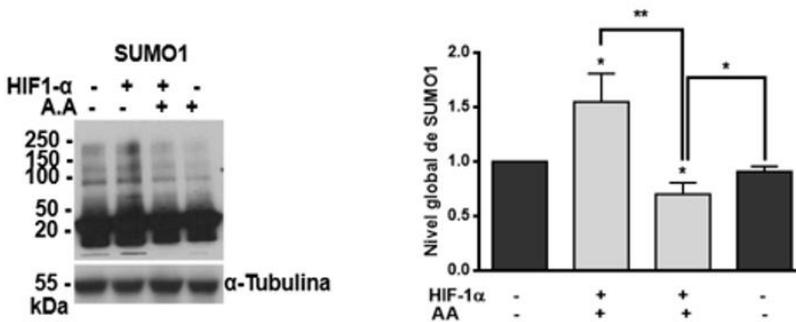


Figura. 20 HIF-1 α potencia la vía de Notch en MSCs a través del incremento de los niveles globales de SUMO1. Análisis de los niveles globales de SUMOilación en MSCs y HIF-MSCs en presencia (+) o ausencia (-) de A.A. La SUMOilación fue detectada con anticuerpo contra SUMO1 y la α -Tubulina se utilizó como control de carga. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. * p <0.05; ** p < 0.01.

Los resultados obtenidos muestran un incremento de los niveles de SUMO1 inducidos por la sobreexpresión de HIF-1 α , correlacionándose con estudios previos donde este fenómeno se produce en condiciones de hipoxia. Los resultados sugieren que el incremento de SUMO1 viene determinado por el factor HIF-1 α y que es capaz de potenciar la vía de Notch.

4.8 SUMO1 modifica postraduccionalmente a N1ICD.

Para explorar la relación funcional entre las vías de señalización HIF-1 α , Notch1 y SUMO1, primero analizamos la secuencia proteica del receptor Notch1 para predecir los sitios susceptibles de SUMOilación. Tras el análisis, se identificaron seis sitios con probabilidad media-alta de representar un sitio de unión de SUMO, tres de ellos en el dominio intracelular. A continuación, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de N1ICD tanto en MSCs como HIF-MSCs utilizando para ello un anticuerpo específico de N1ICD. Las fracciones obtenidas se analizaron por inmunoblot y se reveló el mismo con un anticuerpo específico que reconoce SUMO1 (Fig. 21).

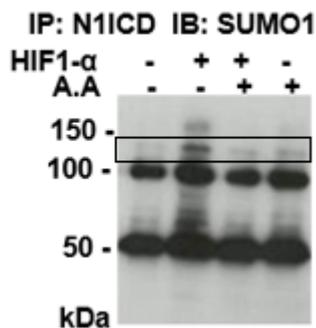


Figura 21. SUMOilación N1ICD. Imagen representativa de inmunoprecipitación (IP) de N1ICD. N1ICD se inmunoprecipitó en MSCs y HIF-MSCs a partir de extractos de células cultivadas en placas tapizadas con Jagged1 para asegurar la activación de la vía, tratadas (+) o no (-) con A.A y las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron por inmunoblot para la determinación de niveles de SUMO1. Observamos que el dominio intracelular de Notch1 es capaz de SUMOilarse, siendo esta modificación postraduccional mayor en las células HIF-MSC con respecto a las MSCs. La SUMOilación se ve revertida con el uso de A.A, siendo mayor la inhibición de la conjugación en las HIF-MSCs.

La inmunoprecipitación nos permite describir por primera vez la SUMOilación del dominio intracelular de Notch1. Además, los niveles de N1ICD SUMOilado fueron mayores en células HIF-MSCs comparado con MSCs, correlacionándose con el incremento de SUMO1 al estabilizar HIF-1 α en experimentos anteriores.

4.9 La SUMOilación de N1ICD aumenta su translocación al núcleo en células MSCs.

Tras conocer la SUMOilación de N1ICD, analizamos cómo esta modificación podía afectar a su localización celular. Para ello llevamos a cabo ensayos de InCell con el fin de cuantificar la translocación nuclear de N1ICD¹¹⁸. Las células se analizaron en presencia/ausencia de Jag y A.A. (Fig. 22).

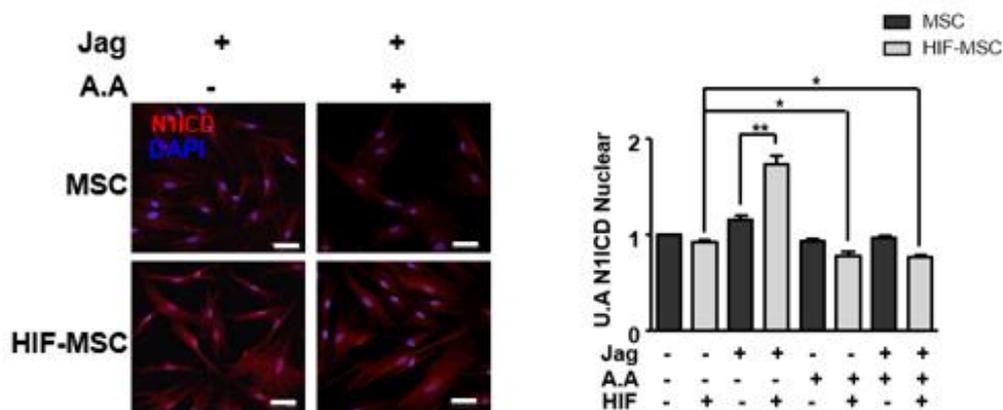


Figura 22 La SUMOilación de N1ICD incrementada por la estabilización de HIF-1 α en MSCs favorece la translocación del dominio al núcleo. Imagen representativa de inmunofluorescencia de N1ICD (rojo) en MSC y HIF-MSCs cultivadas en placas tapizadas con Jagged1 (24h) con (+) o sin (-) A.A (4h). La translocación nuclear de N1ICD se ve incrementada en las HIF-MSCs, efecto revertido por el A.A. Barra de escala: 50 μ m. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el InCell Analyzer para medir unidades de fluorescencia en el núcleo. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. * p <0.05; ** p < 0.01

A continuación, se realizaron experimentos de fraccionamiento subcelular utilizando células MSCs y HIF-MSCs. En esta ocasión los tratamientos de A.A se realizaron con

la vía de Notch activada (Jag+) para asegurar cantidades suficientes de N1ICD. Las fracciones obtenidas se resolvieron por inmunoblot y se cuantificaron por densitometría (Fig. 23).

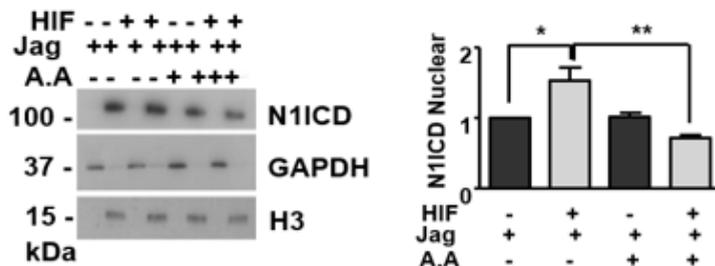


Figura 23 La SUMOilación de N1ICD incrementada por la estabilización de HIF-1 α en MSCs favorece la translocación del dominio al núcleo. Inmunoblot representativo del fraccionamiento subcelular de MSCs y HIF-MSCs. Las células fueron sembradas sobre placas tapizadas con Jagged1 asegurando la activación de la vía. Las células fueron tratadas con (+) o sin (-) A.A. A continuación, la cantidad de N1ICD en el núcleo en las diferentes condiciones fue cuantificada por densitometría. GAPDH fue utilizado como control de carga de la fracción citosólica mientras que Histona 3 (H3) fue el control de carga de la fracción nuclear. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. * p <0.05; ** p < 0.01.

Ambos experimentos confirmaron que una vez la vía de Notch estaba activada los niveles de N1ICD eran significativamente mayores en los núcleos de HIF-MSCs con respecto a MSCs. Además, observamos una reducción de la translocación nuclear de N1ICD al tratar las células con A.A, siendo significativo el efecto en HIF-MSCs.

Los datos obtenidos indican que existe relación molecular entre HIF-1 α , SUMO1 y Notch1. De esta manera, la sobreexpresión de HIF-1 α incrementa los niveles globales de SUMO1, que a su vez incrementa los niveles de SUMOilación proteica incluyendo a N1ICD y como resultado N1ICD incrementa su translocación al núcleo.

4.10 La SUMOilación inducida por HIF-1 α media la migración de las MSCs a través de Notch1

Para comprobar si la SUMOilación de N1ICD tenía un efecto funcional sobre la migración celular, repetimos el experimento de cicatrización con cultivos de MSCs y HIF-MSCs utilizando A.A., el inhibidor de la SUMOilación (Fig. 24).

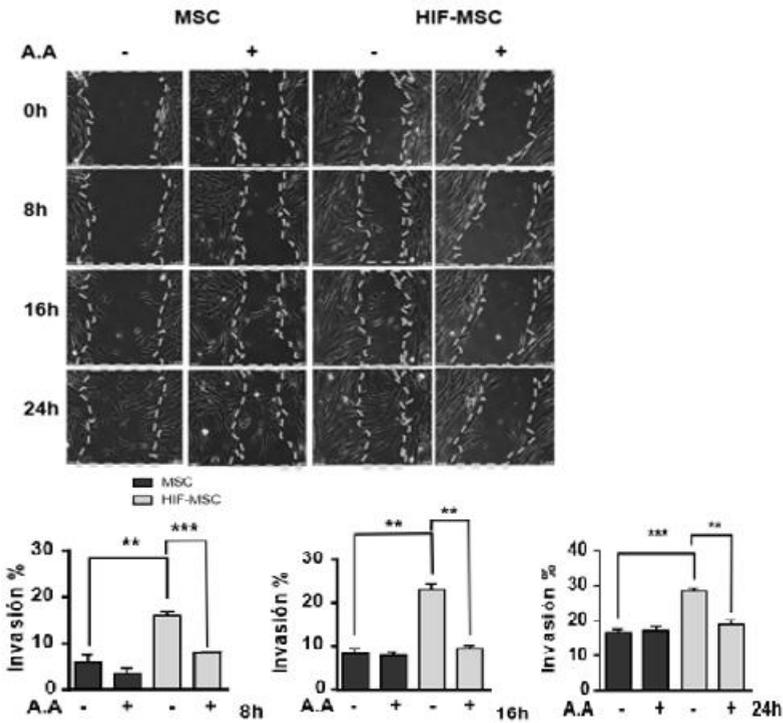


Figura 24. HIF-1 α potencia la migración de las MSCs a través de la SUMOilación. Imágenes representativas de secuencias *time-lapse* en ensayo de cicatrización a diferentes intervalos de tiempo en MSCs y HIF-MSCs tratadas (+) o no (-) con el inhibidor de la SUMOilación denominado A.A. Las líneas punteadas definen el área de la cicatriz. Las gráficas muestran el porcentaje de la invasión de MSCs y HIF-MSCs en células tratadas (+) o no (-) con A.A. calculado a los intervalos de tiempo indicados. Las imágenes fueron tomadas a 100 aumentos. Escala: 100 μ m. Los datos representan media \pm SD de cuatro experimentos independientes. ** p <0.01; *** p <0.001

Los resultados mostraron que el tratamiento con A.A revertía completamente el incremento de la migración observado en las HIF-MSCs con respecto a las MSCs, lo que establece una relación estrecha a nivel molecular y funcional entre las tres vías de señalización; HIF-1 α , Notch1 y SUMO1.

4.11 La SUMOilación de N1ICD en células HEK 293T aumenta en condiciones de hipoxia

Para comprobar si la interacción entre HIF-1 α , Notch1 y SUMO1 era exclusiva de células MSC o podía extenderse a otros tipos celulares, se transfectaron transitoriamente células HEK 293T con el plásmido EF.GFP (HEK 293T) y EF.hICN1.Ubc.GFP (N1ICD- HEK 293T) (Fig. 25). El análisis mediante citometría de flujo mostró que el 95% de las células captaron el vector en cada uno de los casos.

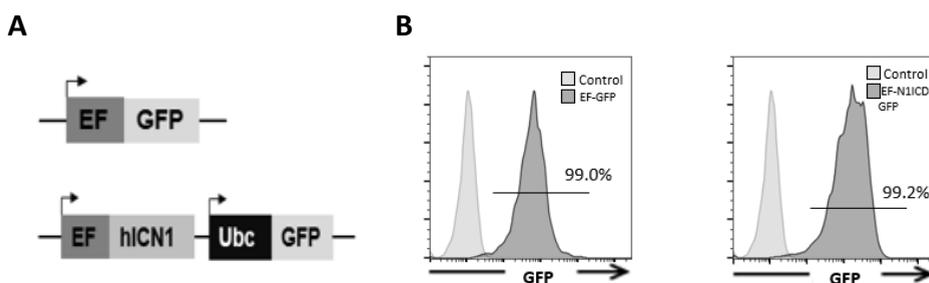


Figura 25. Sobreexpresión de N1ICD en células HEK 293T. (A) Vectores lentivirales EF.GFP y EF.hICN1.Ubc.GFP (B) Análisis por citometría de flujo de las células HEK 293T y N1ICD-HEK 293T

Los resultados se verificaron por inmunoblot analizando la sobreexpresión de N1ICD (Fig. 26). Para comprobar si la proteína N1ICD sobreexpresada era funcional, se comprobaron los niveles de los genes diana de la vía Notch (Hes1, Hey1 y Hey2) mediante RTqPCR.

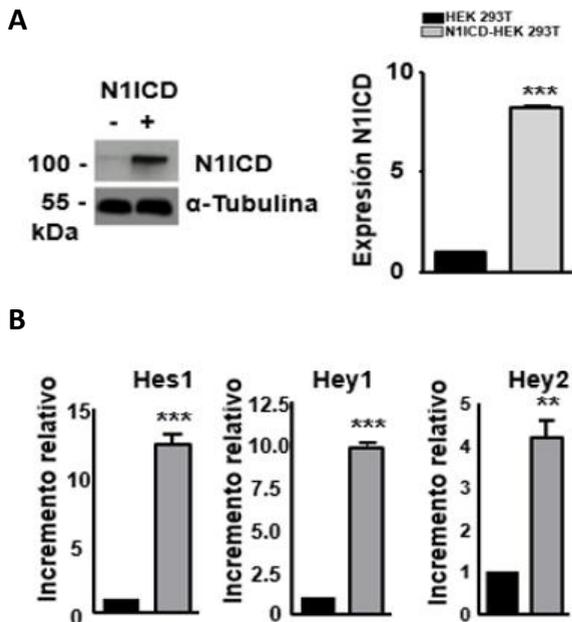


Figura 26. Comprobación de la sobreexpresión y funcionalidad de N1ICD en las células HEK 293T. (A) Inmunoblot representativo de los niveles de proteína N1ICD en células HEK 293T y cuantificación por densitometría. (B) Expresión de los niveles de RNA mensajero relativos de Hes1, Hey1 y Hey2 detectados por RTqPCR en HEK 293T y N1ICD-HEK 293T. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. ** p <0.01, *** p <0.001

Una vez comprobada la sobreexpresión de N1ICD y que además éste era funcional, las células se cultivaron en condiciones de normoxia (21% O₂) o hipoxia (Hx 1% O₂) durante 4h en presencia o ausencia de A.A (las mismas condiciones que previamente se habían utilizado en MSCs). De esta manera pudimos observar si la inhibición de la SUMOilación afectaba a la expresión de dichas proteínas. Se analizó la expresión de N1ICD y HIF-1 α por inmunoblot y se cuantificaron por densitometría de imagen (Fig.27).

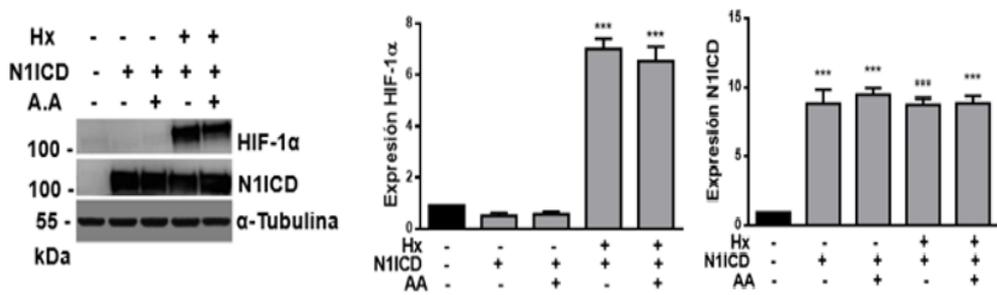


Figura 27. Sobreexpresión de N1ICD y estabilización de HIF-1 α en células HEK 293T. Inmunoblot representativo y cuantificación por densitometría de HIF-1 α para comprobar la inducción de hipoxia y de N1ICD en células HEK 293T tratadas o no con AA. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. *** p <0.001.

Como era de esperar, los cultivos incubados en condiciones de hipoxia aumentaron los niveles de expresión de HIF-1 α .

Del mismo modo que habíamos hecho anteriormente, analizamos la expresión relativa de los genes diana de Notch por RTqPCR (Fig. 28). Lo que observamos fue un incremento significativo de la expresión de los genes diana de Notch en las células N1ICD-HEK 293T cultivadas en condiciones de hipoxia. Además, cuando las células fueron tratadas con A.A, la expresión de los genes Hes1, Hey1 y Hey2 se vio drásticamente reducida, asemejándose a los niveles obtenidos en células N1ICD-HEK 293T en condiciones de normoxia.

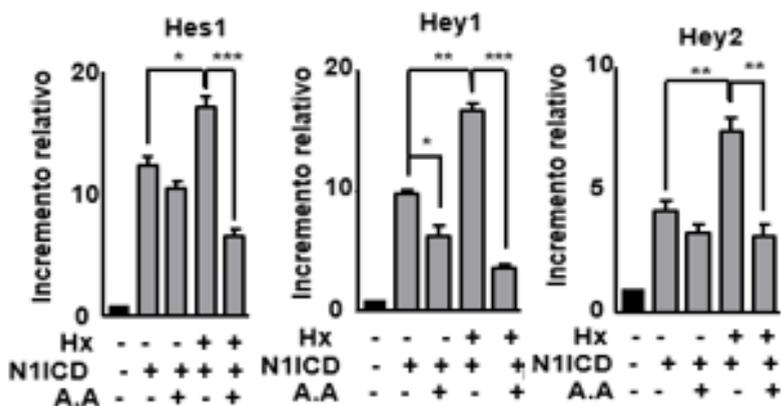


Figura 28. La SUMOilación del dominio intracelular de Notch1 en HEK 293T incrementa la expresión relativa de los genes diana de Notch1 en condiciones de hipoxia. Análisis por RTqPCR de los genes diana de Notch (Hes1, Hey1 y Hey2) en HEK 293T y N1ICD-HEK 293T cultivadas bajo condiciones de hipoxia (Hx +) o normoxia (Hx -) y en presencia (+) o ausencia (-) de A.A. Datos representados como media±SD de tres experimentos independientes. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Finalmente, para confirmar si N1ICD está o no SUMOilado, realizamos un estudio de inmunoprecipitación de N1ICD en condiciones de normoxia o hipoxia y tratadas o no con A.A (Fig. 29). El análisis mediante inmunoblot mostró que efectivamente N1ICD se encontraba SUMOilado tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, siendo la SUMOilación mayor en hipoxia. Además, el tratamiento con A.A disminuía la SUMOilación, especialmente cuando las células se encontraban en condiciones de hipoxia.

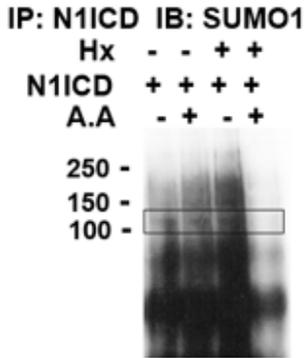


Figura 29 El dominio intracelular de Notch1 sobreexpresado en HEK 293T también es susceptible de ser SUMOilado. Imagen representativa de ensayo de inmunoprecipitación de N1ICD en HEK 293T y N1ICD-HEK 293T cultivadas bajo condiciones de hipoxia o normoxia (Hx+/-) y tratadas o no con A.A (A.A+/-). Los extractos fueron inmunoprecipitados con anticuerpo N1ICD y marcados con anticuerpo SUMO1.

Estos resultados se correlacionan con los resultados previos obtenidos en MSCs, lo que sugiere que N1ICD SUMOilado aumenta también su translocación al núcleo en células HEK 293T, y que esta SUMOilación se ve potenciada por la hipoxia.

4.12 Las mutaciones puntuales en los sitios de SUMOilación de N1ICD, modifican su localización subcelular y modulan su actividad transcripcional en las células HEK 293T

Una vez comprobado que la hipoxia es capaz de incrementar los niveles de SUMOilación de N1ICD (al igual que ocurre con la estabilización de HIF-1 α) en una línea celular diferente de las MSCs, el siguiente paso fue localizar los posibles sitios de SUMOilación dentro de N1ICD. Para ello, obteniendo la secuencia BLAST del receptor Notch1 y recurriendo al programa de predicción de sitios de SUMOilación SUMOplotTM, detectamos tres posibles sitios de SUMOilación dentro de la secuencia correspondiente al dominio intracelular (1754-2555) (Anexo I). Una vez localizadas las lisinas susceptibles de ser SUMOiladas en la proteína: K2049P_N1ICD, K2150P_N1ICD y K2252P_N1ICD decidimos modificar los codones codificantes para lisina (AAG en las tres variantes) por codones codificantes para prolina (CCG)

eliminando los sitios de SUMOilación detectados. De este modo, generamos mutaciones de sustitución que no inducían mutaciones anti-sentido, ni señal de parada en N1ICD. Una vez diseñados los cebadores necesarios, se introdujeron dichas mutaciones mediante el uso de técnicas de mutagénesis dirigida. Una vez insertadas las mutaciones y amplificados los plásmidos se realizaron las secuenciaciones necesarias para comprobar la inserción de las mutaciones en las posiciones correspondientes (Fig 30).

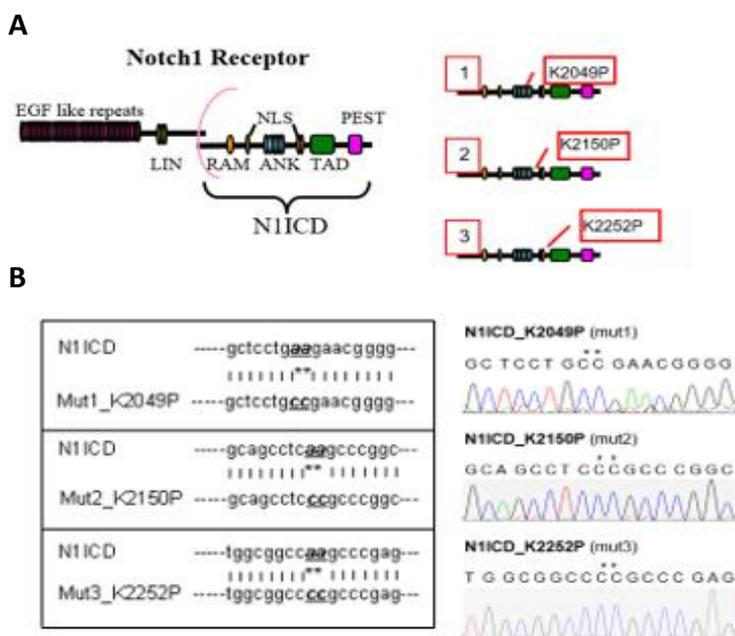


Figura 30. Localización de las lisinas susceptibles de SUMOilación en N1ICD y sustitución de las mismas por prolinas. (A) Esquema ilustrativo de la localización de las lisinas sustituidas por prolinas mediante mutagénesis dirigida. (B) Comprobación de la inserción de las mutaciones en el dominio intracelular de Notch1 mediante secuenciación llevada a cabo por secuenciador NGS MiSeq (Illumina) y analizado mediante los programas Chromas y Clustal Omega.

A continuación, se realizaron digestiones con la enzima Dnp I (digiere DNA metilado y hemimetilado) con el fin de eliminar cualquier rastro de ADN parental. Tras realizar

la transformación de bacterias competentes con los plásmidos generados y su posterior purificación, se secuenciaron para asegurar la inserción de las mutaciones en el lugar adecuado. Como último control de calidad se realizaron las digestiones correspondientes (Fig. 31.)

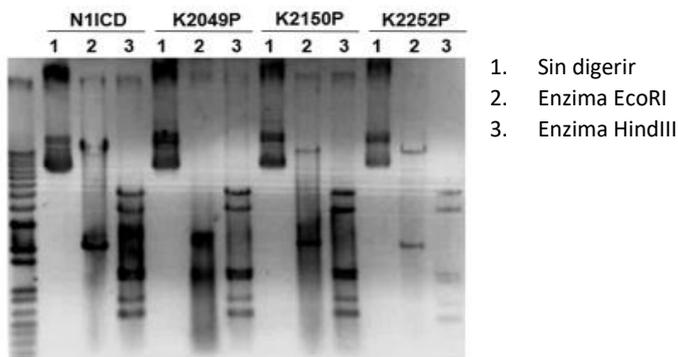


Figura 31. Digestión enzimática de la proteína salvaje, así como de las variantes mutadas.

Una vez comprobadas las posiciones de las mutaciones en los plásmidos, se generaron vectores lentivirales con las tres variantes de N1ICD y las HEK 293T se infectaron de manera estable con la finalidad de estudiar si alguna de las mutaciones inhibía la translocación nuclear de N1ICD. Tras obtener las líneas HEK 293T (GFP), N1ICD, K2049P_N1ICD, K2150P_N1ICD y K2252P_N1ICD, se analizó por inmunoblot la expresión de N1ICD, así como de las variantes mutadas (Fig 32). Se observaron diferencias significativas entre N1ICD y K2252P_N1ICD en condiciones de normoxia y entre N1ICD y K2049P_N1ICD en condiciones de hipoxia, mientras que la mutación K2150P_N1ICD no afectó de manera significativa a su expresión en ninguna de las dos condiciones.

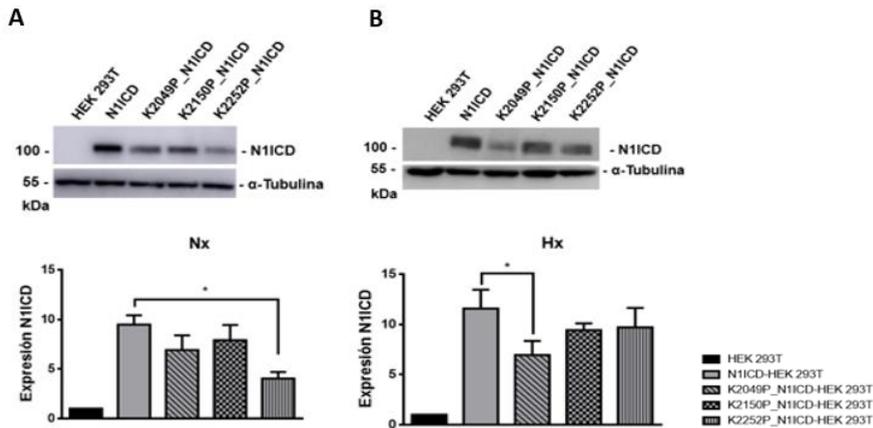
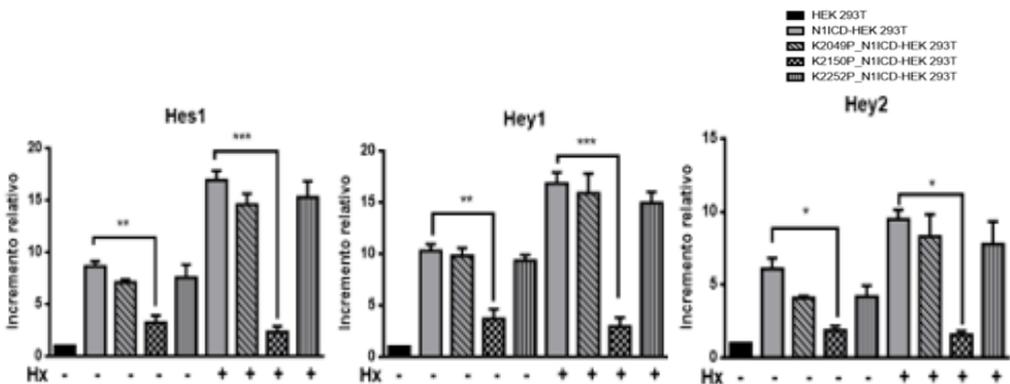


Figura. 32 Análisis proteico de la expresión de N1ICD y las variantes mutadas en HEK 293T. Imágenes representativas de inmunoblot en condiciones de (A) normoxia (Nx) y (B) hipoxia (Hx) de las células HEK 293T, N1ICD y las variantes K2049P_N1ICD, K2150P_N1ICD y K2252P_N1ICD, donde se observa la invariabilidad de la expresión del mutante K2150P_N1ICD. Datos representados como media \pm SD de tres experimentos independientes. * p <0.1.

Del mismo modo, se evaluó también la expresión relativa de los genes diana de la vía de Notch (Fig 33), observándose una disminución significativa en la expresión relativa de dichos genes en el mutante K2150P_N1ICD, siendo esta diferencia más notable cuando las células habían sido cultivadas en condiciones de hipoxia.



via de Notch sea menos activa transcripcionalmente que N1ICD y las otras dos variantes.

A continuación, para asegurar que el efecto de la bajada de actividad transcripcional del mutante K2150P_N1ICD era producida por la imposibilidad de translocarse al núcleo, se llevó a cabo un estudio de fraccionamiento subcelular en condiciones de hipoxia con el fin de identificar la ubicación de las proteínas en la célula (Fig 34).

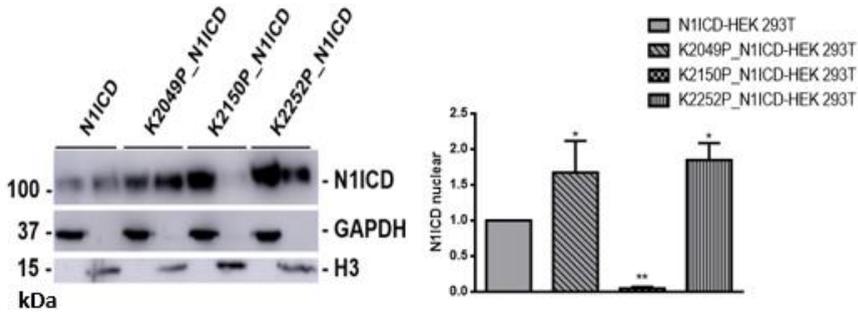


Figura 34 La mutación K20150P_N1ICD inhibe la translocación de N1ICD al núcleo en HEK 293T. Imagen representativa de fraccionamiento celular de N1ICD, K2049P_N1ICD, K2150P_N1ICD, K2252P_N1ICD sometidas a hipoxia. Datos representados como media±SD de tres experimentos independientes * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$.

Los resultados obtenidos en el fraccionamiento celular concuerdan con los observados a nivel de expresión relativa de genes diana de Notch. La mutación K2150P permite la expresión adecuadamente de la proteína, pero imposibilita su translocación al núcleo y como consecuencia se ve reducida la actividad transcripcional de la vía de Notch.

Concluimos por tanto que la lisina localizada en la posición 2150 de N1ICD es necesaria para que se produzca la translocación de N1ICD al núcleo mediada por HIF-1 α y SUMO1. Se trata de un residuo clave para la SUMOilación de N1ICD inducida por hipoxia.

A continuación, para comprobar que los resultados obtenidos con las variantes de N1ICD en las células HEK 293T no eran específicos de dicha línea celular, decidimos utilizar las células MSCs y generar las líneas N1ICD, así como sus variantes mutadas.

4.13 La mutación K2150P-N1ICD inhibe la translocación de N1ICD al núcleo en células MSCs.

Una vez evaluado el efecto de las mutaciones en células HEK 293T, se infectaron células MSCs de manera estable tanto con N1ICD como con las tres variantes mutadas con el objetivo de estudiar si las mutaciones se comportaban de la misma manera. Una vez obtenidas las líneas MSC infectadas establemente con los virus correspondientes (GFP como control, N1ICD, K2049P_N1ICD, K2150P_N1ICD y K2252P_N1ICD), se analizó mediante WB la expresión de N1ICD para comprobar si efectivamente éstas expresaban la proteína (Fig 35). Se observaron diferencias significativas en la expresión de la misma entre N1ICD y K2252P_N1ICD en condiciones de normoxia, al igual que se había observado previamente en células HEK 293T. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en condiciones de hipoxia, aunque sí se observó que la expresión de los mutantes seguía el mismo patrón al observado con anterioridad. Además, la expresión de N1ICD no se vio alterada con la mutación K2150P_N1ICD en condiciones de normoxia e hipoxia.

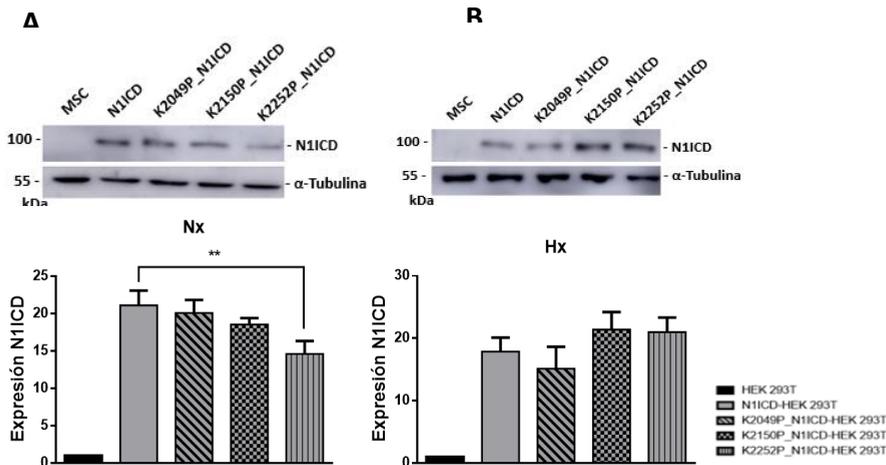


Figura. 35 Análisis proteico de la expresión de N1ICD y las variantes mutadas en hMSCs. Imágenes representativas de WB en condiciones de (A) normoxia (Nx) y (B) hipoxia (Hx) de las células MSC, N1ICD y las variantes K2049P_N1ICD, K2150P_N1ICD y K2252P_N1ICD, donde se observa la invariabilidad de la expresión del mutante K2150P_N1ICD. Datos representados como media±SD de tres experimentos independientes ** $p < 0.01$.

Del mismo modo, se evaluó la expresión relativa de los genes diana de la vía de Notch (Fig 36). Se observó una disminución significativa en la expresión relativa de dichos genes en el mutante K2150P_N1ICD, siendo esta diferencia más importante cuando las células fueron cultivadas en condiciones de hipoxia. Al igual que ocurría anteriormente, resultados similares se obtuvieron con las células HEK 293T.

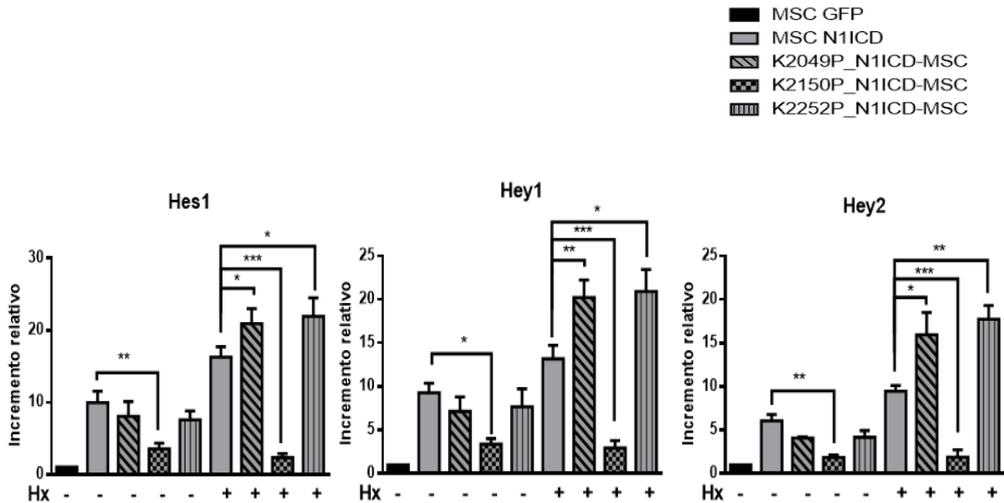


Figura. 36 Los mutantes muestran actividad transcripcional diferencial respecto a N1ICD en condiciones de hipoxia. Análisis por RTqPCR de la expresión relativa de los genes diana de la vía de Notch en condiciones de normoxia o hipoxia (Hx). Como se observa en los histogramas, la actividad transcripcional del mutante K2150P_N1ICD está reducida tanto en normoxia como en hipoxia respecto a N1ICD. En las mismas condiciones, la actividad transcripcional de los mutantes K2049P_N1ICD y K2252P_N1ICD se encuentra significativamente incrementada respecto al factor transcripcional silvestre. Los datos se representan como la media±SD de tres experimentos independientes. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Los resultados obtenidos demuestran que las mutaciones no afectan de manera significativa a la expresión de N1ICD en condiciones de hipoxia. Por el contrario, su actividad transcripcional sí que se ve afectada bajo las mismas condiciones. Siguiendo el patrón de los resultados obtenidos anteriormente en células HEK 293T, el mutante K2150P_N1ICD presenta menor actividad transcripcional con respecto a N1ICD y las otras dos mutaciones estudiadas. Además, las mutaciones K2049P_N1ICD y K2252P_N1ICD tienen una mayor actividad transcripcional que N1ICD en condiciones de hipoxia.

A continuación, para asegurarnos de que el efecto observado en la disminución de actividad transcripcional del mutante K2150P_N1ICD era producida por la imposibilidad de translocarse al núcleo, estudiamos la localización de las proteínas en la célula mediante fraccionamiento subcelular en condiciones de hipoxia (Fig 37).

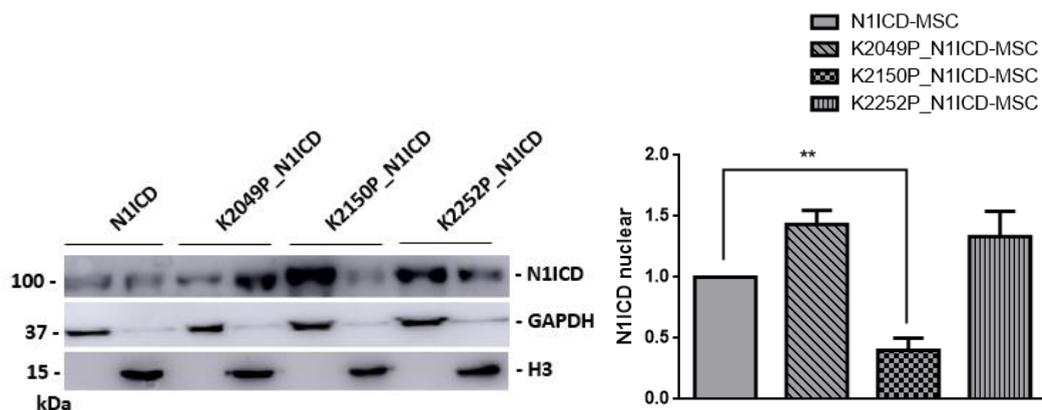


Figura 37 La mutación K20150P_N1ICD inhibe la translocación de N1ICD al núcleo en hMSCs.. Imagen representativa de un ensayo de fraccionamiento celular realizado en condiciones de hipoxia donde se observa la localización de N1ICD, K2049P_N1ICD, K2150P_N1ICD y K2252P_N1ICD. ** $p < 0.01$.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de fraccionamiento celular concuerdan con los observados a nivel de expresión relativa de genes “aguas abajo” de Notch y con los obtenidos utilizando la línea HEK 293T. La mutación K2150P permite la expresión adecuadamente de la proteína, pero impide su translocación al núcleo, como consecuencia se ve reducida la actividad transcripcional de la vía de Notch. Concluimos por tanto que la lisina localizada en la posición 2150 de N1ICD es necesaria para que se produzca la translocación de N1ICD al núcleo mediada por HIF-1 α y SUMO1. Se trata de un residuo clave para la SUMOilación de N1ICD inducida por hipoxia.

Por otra parte, encontramos que no se encuentran diferencias significativas cuando se observan los mutantes K2049P y K2252P, por lo que estas mutaciones incrementan la actividad transcripcional de N1ICD sin afectar su translocación al núcleo.

Para comprobar si estos efectos afectaban la capacidad de proliferación y migración de las células, estudiamos dichos procesos mediante ensayos de BrdU y de cicatrización *in vitro*.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de proliferación mediante la incorporación de BrdU (Fig. 38) en condiciones de normoxia como de hipoxia.

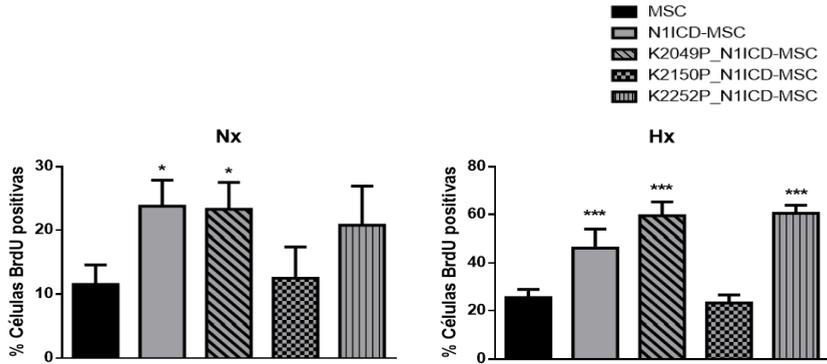


Figura 38. El incremento de la proliferación mediado por la hipoxa en las hMSCs es dependiente del sitio de SUMOilación. Las células MSC, N1ICD-MSC, K2049P_N1ICD, K2150P_N1ICD y K2252P_N1ICD fueron cultivadas en condiciones de normoxia (Nx) y de hipoxia (Hx). Se cuantificó la proliferación en base a la incorporación de BrdU. Datos representados como media±SD de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Los resultados muestran un incremento significativo en la proliferación de las células que expresan N1ICD, K2049P_N1ICD y K2252P_N1ICD con respecto a las MSCs en condiciones de hipoxia. Además, el incremento de la tasa proliferativa mediado por la hipoxia fue reducida por completo en las K2150P_N1ICD MSCs.

Concluimos por lo tanto que los resultados evidencian el papel clave de la posición de la modificación postraduccional SUMO en la proliferación de las MSCs.

Para evaluar el efecto de las mutaciones sobre la migración celular se realizó un ensayo de cicatrización *in vitro* con células MSC, N1ICD-MSC, K2049P_N1ICD-MSC, K2150P_N1ICD-MSC y K2252P_N1ICD-MSC (Fig. 39). En condiciones de hipoxia, se observó que las mutaciones K2049P y K2252P incrementaban de manera significativa la capacidad de migrar de las células, mientras que la mutación K2150P frenó por completo dicho efecto.

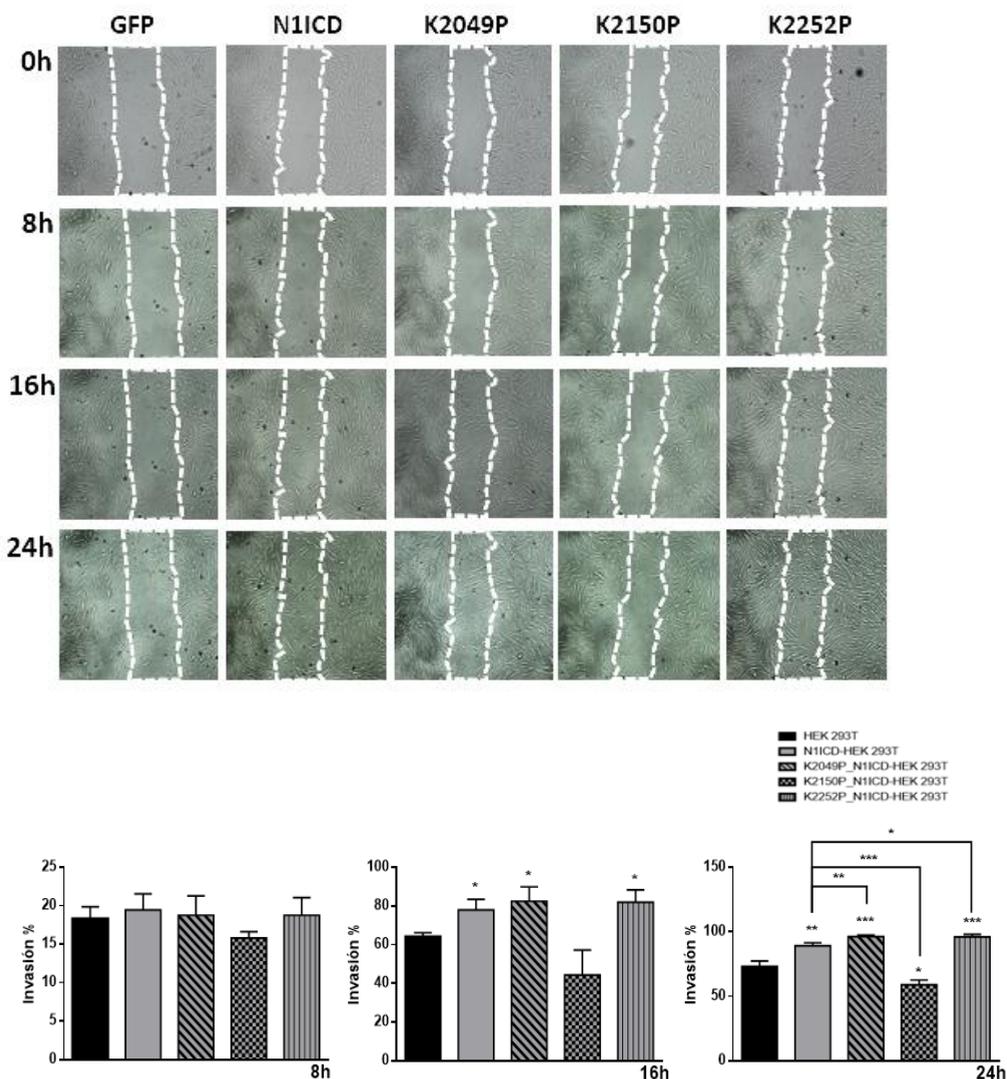


Figura 39. El incremento de la migración mediado por la hipoxia en las hMSCs es dependiente del sitio de SUMOilación. Imágenes representativas de secuencias *time-lapse* en ensayo de cicatrización a diferentes intervalos de tiempo en células MSC, N1ICD-MSC, K2049P_N1ICD, K2150P_N1ICD y K2252P_N1ICD. Las líneas punteadas definen el área de la cicatriz. Las gráficas muestran el porcentaje de la invasión de las células calculado a los intervalos de tiempo indicados. Las imágenes fueron tomadas a 100 aumentos. Escala: 100 μ m. Los datos representan media \pm SD de cuatro experimentos independientes. ** p <0.01; *** p <0.001.

Los resultados muestran un incremento significativo en migración e invasión de las células que expresan N1ICD, K2049P_N1ICD y K2252P_N1ICD con respecto a las MSCs todas en condiciones de hipoxia. Además, existen diferencias significativas entre la migración de las células N1ICD y los mutantes K2019P y K2252P, lo que indica que estas mutaciones favorecen la migración de las MSCs. Este incremento de la migración mediada por la hipoxia, la SUMOilación y N1ICD fue reducido por completo en las K2150P_N1ICD MSCs, migrando con valores significativamente inferiores a las células control.

Concluimos por lo tanto que los resultados evidencian el papel clave de la posición de la modificación postraducciona SUMO en la capacidad migratoria e invasiva de las MSCs.

5 DISCUSIÓN

A lo largo de este trabajo hemos analizado la interacción entre las vías de HIF-1 α , Notch1 y SUMO1 y cómo dicha interacción influye en la biología de las MSCs humanas de pulpa dental. Las vías de HIF y Notch están altamente conservadas en eucariotas y se ven involucradas tanto en el mantenimiento de las propiedades de las células madre como en diferentes situaciones fisiopatológicas^{68,99,161,162}. Por este motivo, hemos centrado nuestros esfuerzos en averiguar cómo alterando dichas vías y junto con la modificación postraduccional SUMO modificamos sus capacidades proliferativas, migratorias e invasoras.

El potencial terapéutico de las células HIF-MSCs ha sido previamente descrito, de hecho nuestro laboratorio demostró previamente que la infusión de HIF-MSCs promovía la regeneración del miocardio en un modelo de infarto agudo de miocardio en rata ¹⁵⁴, pero son necesarios más esfuerzos para esclarecer los mecanismos por los que se producen dichos efectos.

Ha sido descrito que diferentes vías de señalización relacionadas con diversos factores paracrinos, al igual que ciertas interleucinas, se ven reguladas positivamente en las HIF-MSCs. Por ejemplo, los niveles de expresión de la proteína p38 junto con la proteína-quinasa mitógena-activada (p38/MAPK)¹⁶³, JNK/SAP¹⁵⁴, AKT¹⁵⁴ y Notch^{164,165}, junto con la fibronectina^{166,167}, el factor de crecimiento de fibroblastos ^{154,168}, la angiopoyetina-1 (ANGPT1)¹⁶⁹, el factor de crecimiento nervioso (NGF)¹⁷⁰, y componentes de la vía de señalización del factor de crecimiento de la insulina (IGF)^{154,171} son inducidos por el factor de transcripción HIF-1 α .

5.1 Modulación de la vía de Notch en MSCs en presencia o ausencia de HIF-1 α

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de HIF-1 α sobre Notch, se comparó la expresión de los genes diana de Notch en células HIF-MSCs y MSCs.

Se observó que la vía de Notch estaba modulada en función de la confluencia a la cual se sembraron las MSCs, ya que se produjo una auto-activación de la vía cuando las células estaban sembradas a altas confluencias generando una respuesta diferente a la activación producida cuando las células fueron sembradas a baja confluencia y sobre un tapiz de ligando Jagged1. Ambas vías de activación produjeron un incremento de la respuesta en la transcripción de los genes diana mayor en las células HIF-MSCs

con respecto a las células control. Todo esto parece indicar que HIF-1 α actúa como un potenciador de la vía de señalización de Notch una vez el receptor ha sido activado por contacto con su ligando. Estos resultados concuerdan con los estudios publicados previamente en el trabajo del Dr C. Sahlgren *et al* (2008), en los que se demuestra que la hipoxia incrementa los niveles de activación de Notch1 en diferentes líneas tumorales cultivadas en presencia de Jagged1¹¹⁴.

A continuación se analizó la contribución de la vía de Notch en la migración y proliferación de las HIF-MSCs con respecto a las MSCs, ya que la vía de Notch está altamente implicada en estos procesos^{114,156,172}. Observamos que tanto la migración como la capacidad invasiva de las MSCs son reguladas por la señalización de Notch ya que las ventajas migratorias de estas células se vieron reducidas a niveles control al tratar los cultivos con el inhibidor específico de la vía de Notch. Además, dichos procesos se vieron ampliamente reforzados por la presencia de HIF-1 α . Resultados similares respecto a la contribución de HIF-1 α en la mejora de la migración y de la capacidad invasiva dependiente de Notch fueron descritos previamente en líneas celulares de coriocarcinoma¹⁵⁶, lo que sugiere que se trata de un mecanismo común para diferentes líneas celulares. Con respecto a la tasa proliferativa, pudimos comprobar que ésta no se veía afectada en MSCs y en HIF-MSCs cuando eran tratadas con RO, sin embargo, las diferencias significativas encontradas entre estos dos grupos remarcan la importancia de la estabilización de HIF en el proceso.

Estos resultados sugieren que otros mecanismos relacionados con HIF-1 α pueden estar implicados en el proceso. En este sentido, se ha descrito la relación entre HIF-1 α y el miembro de la familia de las ubiquitininas SUMO^{116,149}. A diferencia de la ubiquitinación, las modificaciones postraduccionales con SUMO-1 incrementan la estabilidad de las proteínas nucleares¹⁷³. Estudios previos han demostrado que HIF-1 α es capaz de verse modificado postraduccionalmente *in vitro* por tres de las cuatro isoformas de la proteína SUMO (SUMO-1, -2 Y -3)¹⁷⁴. Por otra parte, también han sido descritos los incrementos de ARN mensajero y de proteína de SUMO-1 tras someter a condiciones de hipoxia a diferentes líneas celulares¹⁷⁵, así como en modelos *in vivo*¹⁴⁹.

Además, la SUMOilación de HIF-1 α tiene como resultado su estabilización así como el incremento de su actividad transcripcional¹¹⁶. Para dilucidar cómo la SUMOilación estaba involucrada en la interacción entre HIF-1 α y Notch1 en MSCs, cultivamos las células en presencia o ausencia de A.A. Observamos que tanto la migración como la proliferación estaban afectadas en MSCs, siendo este efecto mucho más acusado cuando se utilizaron células HIF-MSCs. Los análisis mediante inmunoblot mostraron un incremento global de los niveles de SUMO en HIF-MSCs con respecto a las células

control, y, mediante estudios de inmunoprecipitación pudimos observar por primera vez que el dominio intracelular de Notch1 era capaz de SUMOilarse. Los niveles de SUMOilación de N1ICD fueron mayores en las células HIF-MSCs con respecto a las MSCs, y dicho efecto se revertía tras tratar los cultivos con A.A. La distribución de N1ICD se estudió mediante microscopía de fluorescencia y se observó una disminución de su translocación al núcleo en células HIF-MSC cuando eran tratadas con A.A.

Estos resultados indican que la SUMOilación de N1ICD favorece su translocación al núcleo. Por lo tanto, podemos decir que la sobreexpresión de HIF-1 α incrementa los niveles de SUMO1, así como la SUMOilación de N1ICD, y que dicha SUMOilación favorece su translocación al núcleo. Estos resultados están en concordancia con estudios previamente publicados donde se demuestra que la SUMOilación de ciertas proteínas promueve su localización nuclear^{118,176}..

El efecto de la estabilización de HIF-1 α en células MSCs se resume en el modelo propuesto en la figura 40. La sobreexpresión de HIF-1 α conduce a un incremento de los niveles de N1ICD por estabilización del factor transcripcional, aumentando su vida media o bien por potenciar la actividad de la enzima Y-secretasa¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Al mismo tiempo, HIF-1 α aumenta los niveles celulares de SUMO1, que se refleja en un incremento de la SUMOilación de N1ICD. Este proceso, junto con la translocación nuclear de N1ICD, es sumamente importante para potenciar la proliferación y migración celular de las MSCs, así como para aumentar su capacidad invasiva.

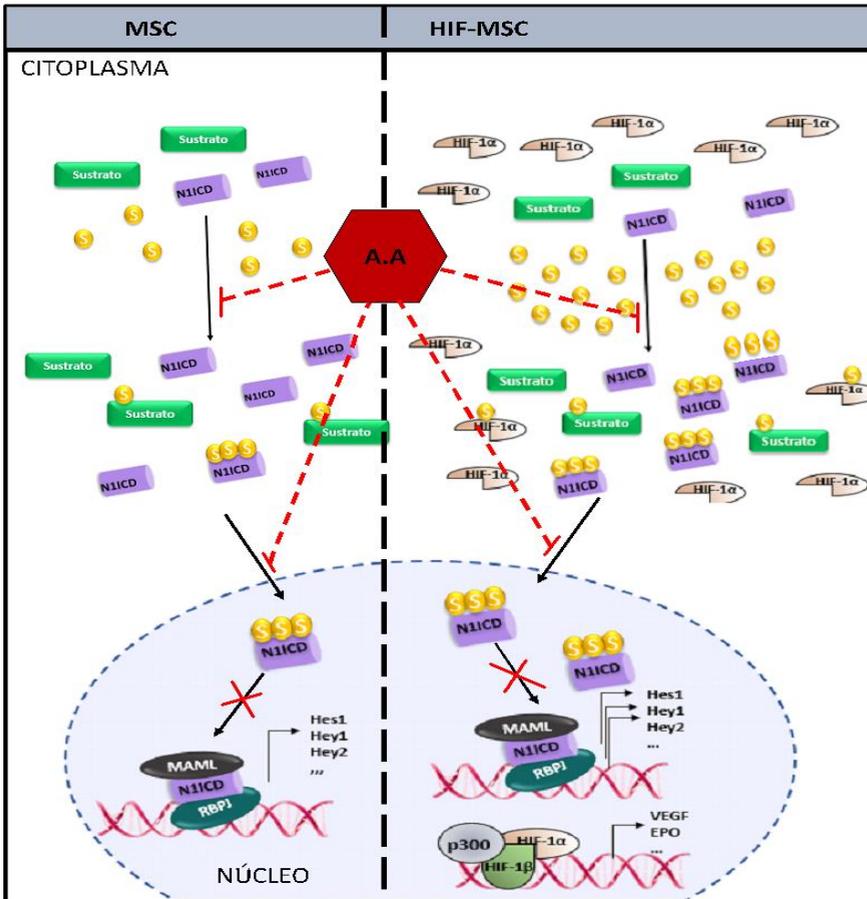


Figura. 40 Modelo propuesto de la interacción entre HIF-1 α , Notch1 y SUMO1 en MSCs. En condiciones de normoxia, HIF-1 α se somete a degradación mediada por ubiquitín-proteasoma, mientras que los niveles de N1ICD SUMOilados son bajos. Cuando se sobreexpresa HIF-1 α , los niveles de SUMO1 incrementan y como consecuencia se produce un incremento de la SUMOilación de N1ICD. El incremento de la SUMOilación de N1ICD favorece su translocación al núcleo lo que hace que se incremente la actividad transcripcional de Notch, mejorando así los mecanismos de migración, invasión y proliferación celular. Cruces rojas indican las consecuencias del tratamiento con A.A.

En resumen, en este apartado demostramos a nivel molecular y celular el mecanismo que subyace a la interacción HIF-1 α -SUMO1-Notch1 en células MSCs humanas y cómo esta interacción resulta en (i) auto-activación de la vía de señalización de Notch, (ii) aumento de la expresión de los ligandos de Notch, (iii) incremento de los niveles de SUMO y de la SUMOilación de N1ICD, (iv) aumento de la translocación nuclear

de N1ICD y (v) incremento en la migración, invasión y proliferación de células HIF-MSCs.

Sin embargo, el papel de SUMO como regulador transcripcional continúa siendo controvertido. Existen trabajos anteriores donde se ha demostrado que la SUMOilación de diferentes factores transcripcionales puede favorecer la represión transcripcional de sus genes diana¹⁸⁰⁻¹⁸², así como otros donde se describe que promueve el reclutamiento de co-activadores transcripcionales como CBP y p300¹⁸³⁻¹⁸⁵. Así pues, con la finalidad de evitar el uso de inhibidores químicos, se identificaron los residuos de lisina claves en el proceso de SUMOilación de N1ICD que se mutaron y sobre los que se realizaron estudios adicionales.

5.2 Respuesta molecular y celular de los mutantes K2049P_N1ICD y K2252P_N1ICD.

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se identificaron los sitios susceptibles de ser SUMOilados. Éstos se mutaron a prolina para impedir que SUMO se uniera a N1ICD. Tras generar las mutaciones K2049P y K2252P, observamos que N1ICD continuaba translocándose al núcleo (Fig. 41). Como se ha descrito con anterioridad, las mutaciones K2049P y K2252P, (i) no afecta a su translocación al núcleo, (ii) incrementa de manera significativa la proliferación, (iii) la migración y (iv) la expresión de los genes diana de Notch en células MSCs cultivadas en condiciones de hipoxia.

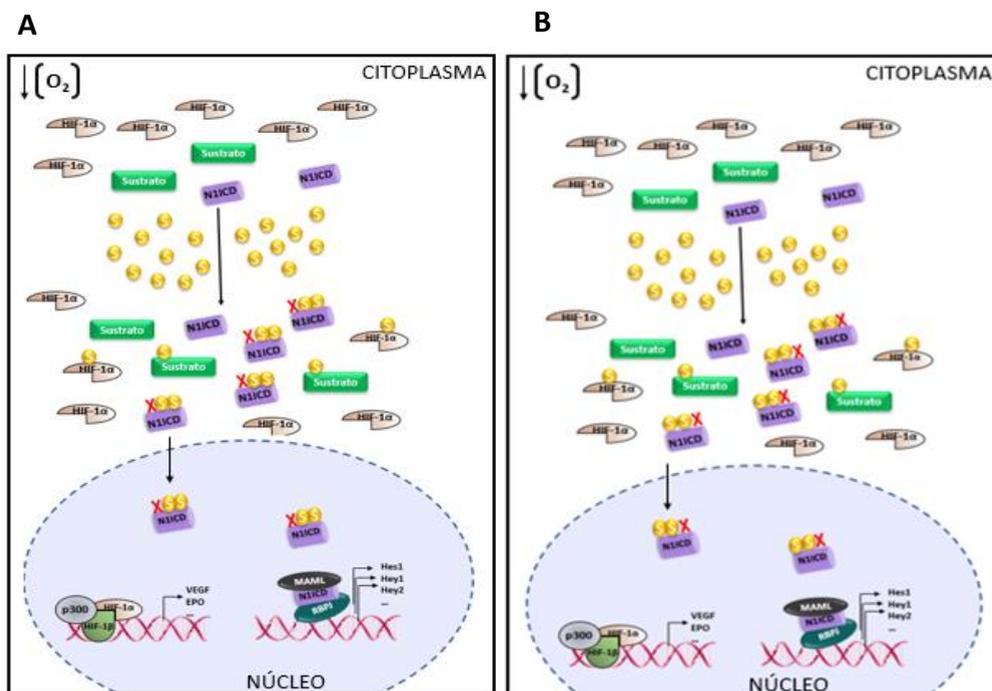


Figura. 41 Modelo propuesto para la interacción entre SUMO1 y K2049P_NIICD (A) y K2252P_NIICD en MSCs cultivadas en condiciones de hipoxia. En condiciones de hipoxia aumentan tanto los niveles de SUMO1 como la SUMOilación de NIICD. Las mutaciones K2049P y K2252P no modifican la translocación de NIICD al núcleo, modula positivamente la activación de la vía, la migración, la capacidad invasiva y la proliferación de las células MSCs.

La mutación K2049P se encuentra en la región terminal de anquirinas, región que forma parte del dominio RAM/ANK. Se ha descrito recientemente que la SUMOilación de NIICD bajo condiciones de estrés en lisinas diferentes a las contempladas en nuestro trabajo, reprime la transcripción de los genes diana de Notch1¹⁸⁶. La descripción de la SUMOilación de NIICD en este trabajo no cierra la puerta a que haya más posibles sitios susceptibles de SUMOilarse en NIICD. La mutación K2049P se encuentra dentro del mismo dominio que las descritas por Antila *et al.* 2018, podríamos pensar que la eliminación de este sitio de SUMOilación dejaría de reprimir la transcripción de Hes1, Hey1 y Hey2, pudiendo reclutar así el complejo co-activador MAML y CBP que conlleva a la activación de la transcripción de los genes diana de Notch^{187,188}.

Por otro lado, se sustituyó la lisina 2252 del dominio intracelular de Notch eliminando así un sitio susceptible de SUMOilarse del dominio PEST. Los resultados obtenidos mostraron que N1ICD continuaba translocándose al núcleo y que se ve incrementada la proliferación, la migración y la expresión de los genes diana de Notch en MSCs. A su vez, dicho efecto es más acusado cuando las células se encuentran bajo condiciones de hipoxia.

Hasta la fecha, se han descrito numerosas mutaciones en el dominio PEST de N1ICD ya que este dominio es esencial para la rápida degradación de la proteína activada de Notch, y mutaciones en esta región se traduce en el incremento de la vida media de la señal, así como se ha correlacionado con una mayor agresividad en los tumores Notch positivos^{138,189}. Podría ocurrir que la mutación K2252P, esté alterando el dominio PEST para la degradación vía proteasoma de N1ICD, y como consecuencia estaríamos observando el incremento de la transcripción de los genes diana de Notch, así como la capacidad migratoria, invasiva y proliferativa de las MSCs. Tanto la SUMOilación de las lisinas 2049 y 2252 del dominio intracelular de Notch1 actúan como represores de la vía de señalización Notch. Ya que eliminando dichos sitios de SUMOilación, se recupera la actividad transcripcional de Notch en MSCs, así como su tasa proliferativa y migratoria, funciones que se ven incrementadas en condiciones de hipoxia.

5.3 Respuesta molecular y celular del mutante K2150P_N1ICD.

La posición 2150 se encuentra posicionada en el dominio de localización nuclear, implicado como su nombre indica en la translocación al núcleo del factor transcripcional N1ICD. La mutación K2150P_N1ICD genera los siguientes efectos sobre N1ICD (figura 42): (i) la reducción de la translocación de K2150P-N1ICD al núcleo, (ii) descenso significativo en la tasa proliferativa, (iii) migratoria y (iv) una disminución significativa de la expresión de los genes diana de la vía de Notch en MSCs, siendo estos efectos más acusados cuando las células son cultivadas en condiciones de hipoxia.

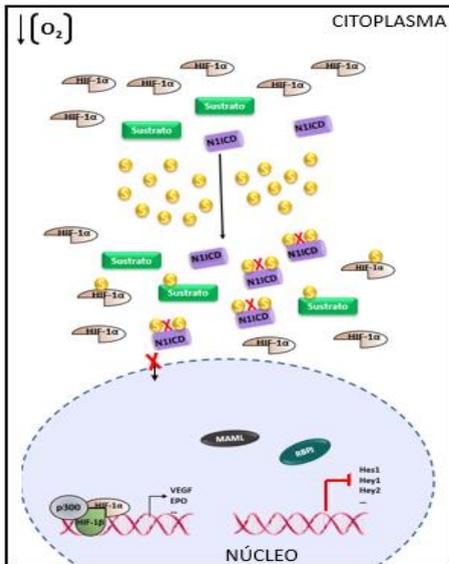


Figura. 42. Modelo propuesto para la interacción entre SUMO1 y K2150P_NIICD en MSCs cultivadas en condiciones de hipoxia. En condiciones de hipoxia se ven incrementados los niveles de HIF-1 α en el citoplasma, aumentando en consecuencia tanto los niveles de SUMO1 como la SUMOilación de NIICD. La mutación K2150P elimina un sitio susceptible de ser SUMOilado en NIICD que está implicado en la translocación de NIICD al núcleo, modulando negativamente la activación de la vía, así como la migración, capacidad invasiva y proliferación de las MSCs.

Existen diversos trabajos donde se detalla la modificación postraduccional SUMO como una señal inductora de la translocación nuclear de diversos factores¹⁸⁸⁻¹⁹². En concordancia con estos datos, podemos concluir que la lisina 2150 del dominio intracelular de Notch1 es un sitio de SUMOilación clave para la translocación de NIICD al núcleo en MSCs. Como consecuencia se produce una disminución de la señalización de la vía de Notch.

5.4 Papel dual de la SUMOilación de N1ICD en las MSCs y modulación de sus propiedades migratorias y proliferativas

Numerosos artículos se han publicado hasta la fecha en los que se describe la activación o represión transcripcional mediada por la modificación postraduccional SUMO^{146,188,190,191}. Además, se ha descrito ampliamente su capacidad de modular la localización de las proteínas, así como su implicación en la translocación nuclear de las mismas¹⁹²⁻¹⁹⁶. Por otra parte, se han realizado numerosos estudios a cerca de la interacción entre la vía de HIF-1 α y Notch1^{114,115,164,177,179,197,198}, así como de la relación entre los niveles generales de SUMOilación y la vía de señalización Notch en líneas tumorales, pero son aún necesarios más estudios para dilucidar la interacción directa entre estas vías¹⁴³.

En resumen, hemos podido observar que la sobreexpresión de HIF-1 α en MSCs ha incrementado la señalización de la vía de Notch una vez se encontraba activada, actuando como un fuerte potenciador de la vía. Estos resultados se plasmaron en la capacidad migratoria e invasiva de las MSCs sobreexpresando HIF-1 α . Tanto la migración como la proliferación de las MSCs es dependiente de la señalización de Notch, ya que, al inhibir la vía con RO, las ventajas obtenidas se vieron reducidas a niveles control, y ambas se ven potenciadas por la estabilización de HIF-1 α .

Por otra parte, pudimos observar que la sobreexpresión de HIF-1 α incrementaba de manera significativa la tasa proliferativa de las MSCs, siendo un efecto directo de la simulación de las condiciones de hipoxia, ya que los resultados obtenidos no se vieron afectados por la inhibición de la vía de Notch. Llegados a este punto, concluimos que debía haber un tercer factor en escenario. Dado el grueso de literatura que relaciona el incremento de los niveles celulares de SUMO en presencia de HIF-1 α o condiciones de hipoxia, inhibimos la SUMOilación. Los resultados obtenidos demostraron que, la ventaja proliferativa de las HIF-MSCs era efecto directo de los incrementos de SUMO debida la presencia de HIF-1 α . Para concluir este apartado, fuimos capaces de establecer una relación directa entre SUMO1 y Notch1, observando mediante ensayos de inmunoprecipitación la SUMOilación de N1ICD. Posteriormente, inhibiendo la SUMOilación tanto en MSCs como en HIF-MSCs fuimos capaces de revertir las ventajas proliferativas e invasoras de las HIF-MSCs a niveles control, obteniendo resultados similares a los obtenidos mediante el tratamiento con RO. En conjunto, los datos apuntan a un mecanismo de regulación postraduccional mediante la proteína

SUMO como modulador de la de la vía de Notch, permitiendo o no la translocación de N1ICD al núcleo.

Por último y para elucidar las posiciones de SUMOilación de N1ICD claves en la modulación de la vía de Notch, se mutaron los tres sitios susceptibles de ser SUMOilados y se generaron estudios de expresión proteica, génica, migratoria, proliferativa y de localización nuclear de N1ICD en MSCs en condiciones de normoxia e hipoxia.

Los resultados apuntan a un papel dual clave de la SUMOilación de N1ICD como mecanismo regulador de la vía, reflejándose en sus propiedades migratorias y proliferativas. Estas mutaciones nos han permitido identificar la lisina 2150 del N1ICD como sitio clave para inducir la translocación nuclear de N1ICD una vez se encuentra SUMOilada. Por otra parte, la SUMOilación de las lisinas 2049 y 2252, actúan favoreciendo la represión transcripcional de los genes diana de Notch (Tabla 15). Por lo que, en un conjunto, es necesaria la SUMOilación de N1ICD para su translocación al núcleo y la SUMOilación diferencial de los sitios establecidos en nuestro trabajo permite una activación o represión de la vía.

Proteína	MSC NORMOXIA				MSC HIPOXIA			
	E. génica	L. nuclear	Migración	Proliferación	E. génica	L. nuclear	Migración	Proliferación
N1ICD	↑	↑	↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
N1ICD+ A.A	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
K_2049_P-N1ICD	↑↑	↑	↑	↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
K_2150_P-N1ICD	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
K_2252_P-N1ICD	↑↑	↑	↑	↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑

Tabla. 15 Resumen del comportamiento de las MSCs utilizadas a lo largo del trabajo. (E. génica: expresión génica; L. nuclear: localización nuclear)

La relación entre la vía de Notch1, HIF-1 α , SUMO1 y el cáncer se han estudiado ampliamente como lo demuestra la amplia bibliografía existente del tema^{72,99,143,157,162,177,199-201}. El nuevo nivel de regulación para N1ICD que se describe en esta tesis podría tener implicaciones en la patogenia de este conjunto de enfermedades, pudiendo servir como diana terapéutica más certera.

Por otra parte, la posibilidad de incrementar de manera controlada la proliferación y la migración de las MSCs, genera un abanico de posibilidades en cuanto a terapia celular se refiere. Con este estudio pretendemos demostrar la posibilidad de modular el comportamiento de las MSCs según su uso para implementar sus capacidades biológicas de cara a un posible uso terapéutico.

6 CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de HIF-1 α en MSCs favorece su translocación al núcleo.
2. La sobreexpresión de HIF-1 α en MSCs ejerce un efecto potenciador de la vía de Notch medida mediante la detección de un incremento en la transcripción de Hes1, Hey1 y Hey2.
3. La sobreexpresión de HIF-1 α incrementa de manera significativa la expresión de ligandos funcionales de la vía de Notch en MSCs.
4. Las células HIF-MSCs tienen ventaja migratoria e invasora significativa frente a las MSCs y dichos efectos están mediados por Notch.
5. Las células HIF-MSCs tienen una tasa proliferativa significativamente mayor que las MSCs no modificadas. Dicho incremento es independiente de la vía de Notch y regulada por el estado de SUMOilación global de la célula.
6. La sobreexpresión de HIF-1 α incrementa los niveles generales de SUMO1, y potencia la vía de Notch a través de la SUMOilación del dominio intracelular de Notch1.
7. La SUMOilación del dominio intracelular de Notch1 incrementa su translocación al núcleo.
8. La SUMOilación de N1ICD se encuentra significativamente incrementado en células HIF-MSCs.

9. Tras realizar mutaciones de sustitución de las lisinas clave de los sitios de SUMOilación por prolina en los tres principales sitios de unión de SUMO detectados en el dominio intracelular de Notch1, tanto en células MSCs como en HEK 293T, observamos que:
- Las posiciones 2049 y 2252 actúan como represores de la vía de señalización Notch.
 - La posición 2150 es un sitio de SUMOilación clave para la translocación de N1ICD al núcleo, su mutación tiene como consecuencia una disminución de la señalización de la vía de Notch.

ANEXO I

Secuencia aminoacídica de la proteína Notch1 introducida en el programa SUMOplot. La zona sombreada indica el dominio intracelular de Notch1, las secuencias rojas son aquellas susceptibles de ser SUMOiladas.

```
1 MPLLAPLLC LALLPALAAR GPRCSQPGET CLNGGKCEAA NGTEACVCGG
51 AFVGPQCQP NPCLSTPCKN AGTCHVVDRR GVADYACSCA LGFSGPLCLT
101 PLDNACLTNP CRNGGTCDLL TLTEYKCRCP PGWSGKSCQQ ADPCASNPCA
151 NGGQCLPFEA SYICHCPPSF HGPTCRQDVN ECGQKPLCR HGGTCHNEVG
201 SYRCVCRATH TGPNCERPYP PCSPSPCQNG GTCRPTGDVT HECACLPGFT
251 GQNCEENIDD CPGNNCKNG ACVDGVNTYN CRCPPEWTGQ YCTEDVDECO
301 LMPNACQNGG TCHNTHGGYN CVCVNGWTGE DCSENIDDCA SAACFHGATC
351 HDRVASFYCE CPHGRTGLLC HLNDACISNP CNEGSNCDTN PVNGKAICTC
401 PSGYTGPACS QDVDECSLGA NPCEHAGKCI NTLGSFECQC LQYTGPRCE
451 IDVNECVSNP CQNDATCLDQ IGEFQCICMP GYEGVHCEVN TDECASSPCL
501 HNGRCLDKIN EFQCECPTGF TGHLQCQYDQV ECASTPCKNG AKCLDGPNTY
551 TCVCTEGYTG THCEVDIDEC DPDPCHYGSC KDGVAFTFCL CRPGYTGHH
601 GINNECESSY PCRHGCTCQD RDNAYLCFCL KGTTPNCEI NLDDCASSPC
651 DSGTCLDKID GYECACEPGY TGSMCNINID ECAGNPCHNG GTCEDGINGF
701 TCRCPGYHD PTCLSEVNEC NSNPCVHGAC RDSLNGYKCD CDPGWSGTNC
751 DINNECESN PCVNGGTCKD MTSGYVCTCR EGFSGPNCQT NINECASNPC
801 LNQGTCIDDV AGYKCNCLLP YTGATCEVVL APCAPSPCRN GGECRQSEDY
851 ESFSCVPTG WQQGTCEVDI NECVLSPCRH GASCQNTGG YRCHCQAGYS
901 GRNCETDIDD CRPNPCHNGG SCTDGINAF CDCLPGFRGT FCEEDINECA
951 SDPCRNGANC TDCVDSYTCT CPAGFSGIHC ENNTPDCTES SCFNGTCCVD
1001 GINSFTCLCP PGFTGSYCQH DVNECDSQPC LHGGTCQDGC GSYRCTCPQG
1051 YTGPNQNLV HWCDSPPCKN GGKCWQTHQ YRCECPSGWT GLYCDVPSVS
1101 CEVAAQRQGV DVARLCQHGG LCVDAGNTHH CRCQAGYTG YCEDLVDECS
1151 PSPCQNGATC TDYLGYSCK CVAGYHGVNC SEEIDECLSH PCQNGGTCLD
1201 LPNTYKSCSP RGTQGVHCEI NVDDCNPPVD PVSRSKPCFN NGTCVDQVGG
1251 YSCTCPPGFV GERCEGDVNE CLSNPCDARG TQNCVQRVND FHCECRAHT
1301 GRRCESVING CKGKPKNGG TCAVASNTAR GFICKCPAGF EGATCENDAR
1351 TCGSLRCLNG GTCISGPRSP TCLCLGPFTG PECQFPASS CLGGNPCYNQ
1401 GTCEPTSEP FYRCLCPAKF NGLLCHILDY SFGGGAGRDI PPLIEEACE
1451 LPECQEDAGN KVCSLQCNH ACGWDGGDCS LNFNDPWKNC TQSLQCWKYF
1501 SDGHCDSDQN SAGCLFDGFD CQRAEQCNP LYDQYCKDHF SDGHCDQGCN
1551 SAECEWDGLD CAEHVPERLA AGTLVVVLM PPEQLRNSSF HFLRELSRVL
1601 HTNVVFKRDA HGQQMIFPHY GREELRKH IPKRAAEGWAA PDALLGQVKA
1651 SLLPGGSEGG RRRRELDPM D VRSIVYLEI DNRQCVQASS QCFQSATDVA
1701 AFLGALASLG SLNIPYKIEA VQSETVEPPP PAQLHFMYVA AAFAVLLFFV
1751 GCGVLLSRKR RRQHGQLWFP EGFKVSEASK KKRREPLGED SVGLKPLKNA
1801 SDGALMDDNQ NEWGDELET KFRFEPPV LPDLDDQTDH RQWTQQHLDA
1851 ADLRMSAMAP TPPQGEVDAD CMDVNVVRGP GFTPLMIASC SGGLETGNS
1901 EEEEDAPAVI SDFIYQASL HNQTDRTGET ALHLAARYSR SDAKRLLA
1951 SADANIQDNM GRTPLHAAVS ADAQGVFQIL IRNRATDLDA RMHDGTTPLI
2001 LAARLAVEGM LEDLINSHAD VNAVDDLKGS ALHWAAAVNN VDAAVVLLKN
2051 GANKDMQNNR EETPLFLAAR EGSYETAKVL LDHFANRDI DHMDRLPRDI
2101 AQERMHHDIV RLLDEYNLVR SPQLHGAPLG GTPTLSPPLC SPNGYLSLK
2151 PGVQGGKVRK PSSKGLACGS KEAKDLKARR KKSQDGGKCL LDSSGMLSPV
```

2201 DSLESPHGYL SDVASPPLL SPFQQSPSVP LNHLPGMPDT HLGIGHLNVA
2251 **AKPE**MAALGG GGRLAFETGP PRLSHLPVAS GTSTVLGSSS GGALNFTVGG
2301 STSLNGQCEW LSRLQSGMVP NQYNPLRGSV APGPLSTQAP SLQHGMVGPL
2351 HSSLAASALS QMMSYQGLPS TRLATQPHLV QTQQVQPQNL QMQQQNLQPA
2401 NIQQQQLQP PQQPPHGLG VSSAASGHLG RSFLSGEPSQ ADVQPLGPSS
2451 LAVHTILPQE SPALPTSLPS SLVPPVTAAQ FLTPPSQHSY SSPVDNTPSH
2501 QLQVPEHPFL TPSPESPDQW SSSPHSNVS DWSEGVSSPP TSMQSQIARI
2551 PEAFK

BIBLIOGRAFÍA

1. Panés, J. *et al.* Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet* **388**, 1281–1290 (2016).
2. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells *Developmental Biology* : **78**, 7634–7638 (1981).
3. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **282**, 1145–1148 (1998).
4. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
5. Ramiya, V. K. *et al.* Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat. Med.* **6**, 278–282 (2000).
6. Kedes, D. H. & Ganem, D. Insulin-Secreting Cells Derived From in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice Embryonic Stem Cells Normalize Glycemia. *J. Clin. Invest.* **99**, 2082–2086 (1997).
7. Kroon, E. *et al.* Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat. Biotechnol.* **26**, 443–452 (2008).
8. Segers, V. F. M. & Lee, R. T. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* **451**, 937–942 (2008).
9. Williams, A. R. & Hare, J. M. Mesenchymal stem cells: Biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ. Res.* **109**, 923–940 (2011).
10. Messina, E. *et al.* Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ. Res.* **95**, 911–921 (2004).
11. Fortier, L. A. Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications. *Vet. Surg.* **34**, 415–423 (2005).
12. Rippon, H. J. & Bishop, A. E. Embryonic stem cells. *Cell Prolif.* **37**, 23–34 (2004).
13. Kang, H.-J. *et al.* Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction. *Lancet* **363**, 751–6 (2004).

14. Koc, O., Day, J., Neider, M., Gerson, S. & Lazarus, H. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous blood stem cells and culture expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **18**, 307–316 (2000).
15. Sacco, A., Doyonnas, R., Kraft, P., Vitorovic, S. & Blau, H. M. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* **456**, 502–506 (2008).
16. Qu-petersen, Z. *et al.* Identification of a novel population of muscle stem cells in mice : potential for muscle regeneration. 851–864 (2002). doi:10.1083/jcb.200108150
17. Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D. A., García-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* **97**, 703–716 (1999).
18. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760 (2006).
19. Stamm, C. *et al.* Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361**, 45–46 (2003).
20. Michel, M. *et al.* Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J. Cell Sci.* **109** (Pt 5, 1017–1028 (1996).
21. Toma, J. G. *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* **3**, 778–784 (2001).
22. Atari, M. *et al.* Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J. Cell Sci.* **125**, 3343–3356 (2012).
23. Yalvac, M. E. *et al.* Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: Implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J.* **10**, 105–113 (2010).
24. Cordeiro, M. M. *et al.* Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. *J. Endod.* **34**, 962–969 (2008).
25. Roskams, T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* **25**, 3818–3822 (2006).
26. Sangiorgi, E. & Capecchi, M. R. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* **40**, 915–920 (2008).
27. He, X. C. *et al.* BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt– β -catenin signaling. *Nat. Genet.* **36**, 1117–1121 (2004).
28. Bhartiya, D. & Patel, H. Ovarian stem cells—resolving controversies. *J. Assist. Reprod. Genet.* **35**, 393–398 (2018).

29. Goossens, E. & Tournaye, H. Testicular stem cells. *Semin. Reprod. Med.* **24**, 370–378 (2006).
30. Schipani, E., Kronenberg, H. M. & Unit, E. Adult mesenchymal stem cells. 1–12 doi:10.3824/stembook.1.38.1
31. Bruder, S. P. *et al.* Bone Regeneration by Implantation of Purified , Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells. (1998).
32. Sasaki, M. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Transdifferentiation into Multiple Skin Cell Type. *J. Immunol.* **180**, 2581–2587 (2008).
33. Lopatina, T. *et al.* Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth De Novo. *PLoS One* **6**, (2011).
34. Ponticiello, M. S., Schinagl, R. M., Kadiyala, S. & Barry, F. P. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 246–255 (2000).
35. Hess, D. *et al.* Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat. Biotechnol.* **21**, 763–770 (2003).
36. Lin, F. *et al.* Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1188–1199 (2003).
37. Weissman, I. L. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**, 157–168 (2000).
38. Verfaillie, C. Pluripotent stem cells. *Transfus. Clin. Biol.* **16**, 65–69 (2009).
39. A. J. Friedenstein *et al.* THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MARROW AND SPLEEN CELLS. 393–403 (1970).
40. Pittenger, M. F. *et al.* Pittenger1999. **284**, 143–148 (1999).
41. Horwitz, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC : The International Society for Cellular Therapy position statement. **7**, 393–395 (2005).
42. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
43. Squillaro, T., Peluso, G. & Galderisi, U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant.* **25**, 829–48 (2016).
44. Chen, L.-B., Jiang, X.-B. & Yang, L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J. Gastroenterol.* **10**, 3016–3020 (2004).

45. Wu, Y., Chen, L., Scott, P. G. & Tredget, E. E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* **25**, 2648–2659 (2007).
46. Wei, X. *et al.* Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 747–754 (2013).
47. Kenneth W. Liechty *et al.* Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after. *Nat. Med.* **6**, (2001).
48. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 726–736 (2008).
49. Shi, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells: A new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res.* **20**, 510–518 (2010).
50. Bernardo, M. E. & Fibbe, W. E. Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* **13**, 392–402 (2013).
51. Wang, J., Liao, L. & Tan, J. Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 893–909 (2011).
52. Horwitz, E. M. *et al.* Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8932–7 (2002).
53. Forte, A. *et al.* Mesenchymal stem cells effectively reduce surgically induced stenosis in rat carotids. *J. Cell. Physiol.* **217**, 789–799 (2008).
54. KERN, S. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow , Umbilical Cord Blood , or Adipose Tissue AND. 1294–1301 (2006). doi:10.1634/stemcells.2005-0342
55. Patricia A. Zuk *et al.* Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2372–2384 (2003).
56. Endocrine, P. *et al.* Multipotential Nestin-Positive Stem Cells Isolated From. **50**, 521–533 (2014).
57. Mishra, L. *et al.* Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **49**, 318–329 (2009).
58. Rieckstina, U. *et al.* Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev. Reports* **5**, 378–386 (2009).
59. De Bari, C., Dell ’accio, F., Tylzanowski, P. & Luyten, F. P. Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Synovial Membrane. *Arthritis Rheum.* **44**, 1928–1942 (2001).

60. Lee, O. K. *et al.* Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**, 1669–1675 (2004).
61. Bender Kim, C. F. *et al.* Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* **121**, 823–835 (2005).
62. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13625–30 (2000).
63. Seo, B.-M. *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**, 149–155 (2004).
64. Nardi, N. B. & Meirelles, S. *Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization*. **174**, (2006).
65. Covas, D. T. *et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+perivascular cells and fibroblasts. *Exp. Hematol.* **36**, 642–654 (2008).
66. Gronthos, S. *et al.* Stem Cell Properties of. (2002).
67. Noh, H. Bin, Ahn, H.-J., Lee, W.-J., Kwack, K. & Kwon, Y. Do. The molecular signature of in vitro senescence in human mesenchymal stem cells. *Genes Genomics* **32**, 87–93 (2010).
68. Tsai, C. C. *et al.* Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* **117**, 459–469 (2011).
69. Fehrer, C. *et al.* Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* **6**, 745–757 (2007).
70. Basciano, L. *et al.* Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol.* **12**, 12 (2011).
71. Greijer, A. E. *et al.* Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor I (HIF-I). *J. Pathol.* **206**, 291–304 (2005).
72. Schito, L. & Semenza, G. L. Hypoxia-Inducible Factors : Master Regulators of Cancer Progression. *TRENDS in CANCER* **2**, 758–770 (2016).
73. Schneider, J. *et al.* Local oxygen homeostasis during various neuronal network activity states in the mouse hippocampus. (2017). doi:10.1177/0271678X17740091
74. Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the HIF system. *Nat. Med.* **9**, 677–684 (2003).

75. Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C., Ralph, S. J., Rodríguez-Enríquez, S. & Moreno-Sánchez, R. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev. Med. Chem.* **9**, 1084–101 (2009).
76. Rankin, E. B. *et al.* The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO. *Cell* **149**, 63–74 (2012).
77. Gordan, J. D., Bertout, J. A., Hu, C. J., Diehl, J. A. & Simon, M. C. HIF-2 α Promotes Hypoxic Cell Proliferation by Enhancing c-Myc Transcriptional Activity. *Cancer Cell* **11**, 335–347 (2007).
78. Rey, S. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc. Res.* **86**, 236–242 (2010).
79. Greijer, A. E. & Van Der Wall, E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J. Clin. Pathol.* **57**, 1009–1014 (2004).
80. Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 343–354 (2004).
81. Palmer, L. A., Semenza, G. L., Stoler, M. H. & Johns, R. A. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **274**, L212–L219 (1998).
82. Forsythe, J. A. *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4604–4613 (1996).
83. Gleadle, J. M. & Ratcliffe, P. J. Induction of hypoxia-inducible factor-1, erythropoietin, vascular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 by hypoxia: evidence against a regulatory role for Src kinase. *Blood* **89**, 503–9 (1997).
84. Graven, K. K., Yu, Q., Pan, D., Roncarati, J. S. & Farber, H. W. Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1447**, 208–218 (1999).
85. Semenza, G. *et al.* Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**, 32529–32537 (1996).
86. Ali, S. S. *et al.* Hypoxia-adaptation involves mitochondrial metabolic depression and decreased ROS leakage. *PLoS One* **7**, 1–8 (2012).
87. Semenza, G. L. A compendium of proteins that interact with HIF-1 α . *Exp. Cell Res.* **356**, 128–135 (2017).
88. Dewhirst, M. W., Cao, Y. & Moeller, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 425–437 (2008).
89. Spinella, F., Rosanò, L., Di Castro, V., Natali, P. G. & Bagnato, A. Endothelin-1

- induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1?? in ovarian carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 27850–27855 (2002).
90. Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M. & Wenger, R. H. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* **272**, 20055–20062 (1997).
 91. Wang, G. L. & Semenza, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Genetics* **90**, 4304–4308 (1993).
 92. Caniggia, I. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J. Clin. Invest.* **105**, 577–87 (2000).
 93. Jung, Y.-J., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J. & Neckers, L. IL-1 mediated up-regulation of HIF-1 via an NFkB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J.* **17**, 2115–7 (2003).
 94. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 5510–5514 (1995).
 95. Yu, F., White, S. B., Zhao, Q. & Lee, F. S. HIF-1 binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9630–9635 (2001).
 96. Jaakkola, P. *et al.* Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science (80-.)*. **292**, 468–472 (2001).
 97. McNeill, L. A. *et al.* Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. *Biochem. J.* **367**, 571–5 (2002).
 98. Safran, M. & Kaelin, W. G. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J. Clin. Invest.* **111**, 779–783 (2003).
 99. Hong, S.-S., Lee, H. & Kim, K.-W. HIF-1 α : a valid therapeutic target for tumor therapy. *Cancer Res. Treat.* **36**, 343–53 (2004).
 100. Dosenko, V. & Mankovska, I. M. HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α and HIF-1 β mRNA Expression changes in different tissues under intermittent hypoxic training. in (2009).
 101. Cockman, M. E. *et al.* Hypoxia inducible factor-?? binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 25733–25741 (2000).
 102. Ohh, M. *et al.* Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat. Cell Biol.* **2**, 423–427 (2000).
 103. Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible

- factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271–275 (1999).
104. Mahon, P. C., Hirota, K. & Semenza, G. L. FIH- A novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* **15**, 2675–2686 (2001).
 105. Hay, R. T. SUMO: A history of modification. *Mol. Cell* **18**, 1–12 (2005).
 106. Mottet, D. *et al.* Role of ERK and calcium in the hypoxia-induced activation of HIF-1. *J. Cell. Physiol.* **194**, 30–44 (2003).
 107. Qi, J., Pellecchia, M. & Ronai, Z. A. The Siah2-HIF-FoxA2 axis in prostate cancer – new markers and therapeutic opportunities. *Oncotarget* **1**, 379–385 (2010).
 108. Clambey, E. T. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α -dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E2784–E2793 (2012).
 109. Kim, S.-H. *et al.* Regulation of the HIF-1 α stability by histone deacetylases. *Oncol. Rep.* **17**, 647–651 (2007).
 110. Depping, R. *et al.* Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin α/β pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1783**, 394–404 (2008).
 111. Chachami, G. *et al.* Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 α into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 235–240 (2009).
 112. Ahluwalia, a. & S. Tarnawski, a. Critical Role of Hypoxia Sensor - HIF-1 α in VEGF Gene Activation. Implications for Angiogenesis and Tissue Injury Healing. *Curr. Med. Chem.* **19**, 90–97 (2012).
 113. Villa, J. C. *et al.* Nontranscriptional Role of Hif-1 α in Activation of γ -Secretase and Notch Signaling in Breast Cancer. *Cell Rep.* 1077–1092 (2014). doi:10.1016/j.celrep.2014.07.028
 114. Sahlgren, C., Gustafsson, M. V., Jin, S., Poellinger, L. & Lendahl, U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 6392–6397 (2008).
 115. Gustafsson, M. V. *et al.* Hypoxia requires Notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev. Cell* **9**, 617–628 (2005).
 116. Bae, S. H. *et al.* Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 394–400 (2004).
 117. Carbia-Nagashima, A. *et al.* RSUME, a Small RWD-Containing Protein, Enhances SUMO Conjugation and Stabilizes HIF-1 α during Hypoxia. *Cell* **131**, 309–323 (2007).

118. Seeler, J. S. & Dejean, A. Nuclear and unclear functions of sumo. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 690–699 (2003).
119. de la Pompa, J. L. *et al.* Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**, 1139–48 (1997).
120. Lobry, C., Oh, P., Mansour, M. R., Look, A. T. & Aifantis, I. Review Article Notch signaling : switching an oncogene to a tumor suppressor. **123**, 2451–2460 (2018).
121. Joutel, A. *et al.* Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* **383**, 707–710 (1996).
122. Blanpain, C., Lowry, W. E., Pasolli, H. A. & Fuchs, E. Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev.* **20**, 3022–3035 (2006).
123. Bjornson, C. R. R. *et al.* Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells* **30**, 232–242 (2012).
124. Androutsellis-Theotokis, A. *et al.* Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* **442**, 823–826 (2006).
125. Aguirre, A., Rubio, M. E. & Gallo, V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature* **467**, 323–327 (2010).
126. Ables, J. L. *et al.* Notch1 Is Required for Maintenance of the Reservoir of Adult Hippocampal Stem Cells. *J. Neurosci.* **30**, 10484–10492 (2010).
127. Koyanagi, M. *et al.* Notch signaling contributes to the expression of cardiac markers in human circulating progenitor cells. *Circ. Res.* **101**, 1139–1145 (2007).
128. De la Pompa, J. L. & Epstein, J. A. Coordinating Tissue Interactions: Notch Signaling in Cardiac Development and Disease. *Dev. Cell* **22**, 244–254 (2012).
129. High, F. A. & Epstein, J. A. The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 49–61 (2008).
130. Kovall, R. A., Gebelein, B., Sprinzak, D. & Kopan, R. The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural and Biochemical Insights into Shape, Sugar, and Force. *Dev. Cell* **41**, 228–241 (2017).
131. Wang, H., Zang, C., Liu, X. S. & Aster, J. C. The role of notch receptors in transcriptional regulation. *J. Cell. Physiol.* **230**, 982–988 (2015).
132. Krebs, L. T. *et al.* Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. *Genes Dev.* **17**, 1207–1212 (2003).
133. Cheng, H. *et al.* Notch2 (but not Notch1) is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *NIH Public Access* **134**, 801–811 (2009).
134. de Celis, J. F. & Bray, S. J. The Abruption domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. *Development* **127**, 1291–1302

- (2000).
135. Malecki, M. J. *et al.* Leukemia-Associated Mutations within the NOTCH1 Heterodimerization Domain Fall into at Least Two Distinct Mechanistic Classes. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4642–4651 (2006).
 136. Gordon, W. R. *et al.* Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 295–300 (2007).
 137. Brou, C. *et al.* A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: The role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* **5**, 207–216 (2000).
 138. Steinbuck, M. P. & Winandy, S. A review of Notch processing with new insights into ligand-independent notch signaling in T-cells. *Front. Immunol.* **9**, 1–11 (2018).
 139. D'Souza, B., Meloty-Kapella, L. & Weinmaster, G. Canonical and non-canonical notch ligands. *Curr. Top. Dev. Biol.* **92**, 73–129 (2010).
 140. Cordle, J. *et al.* A Conserved Face of the Jagged/Serrate DSL Domain is Involved in Notch Trans-Activation and Cis-Inhibition. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 849–857 (2009).
 141. Komatsu, H. *et al.* OSM-11 facilitates LIN-12 notch signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *PLoS Biol.* **6**, 1730–1745 (2008).
 142. Wendy R. Gordon *et al.* Mechanical Allosterity: Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. *Dev Cell* **179**, 95–105 (2016).
 143. Licciardello, M. P. *et al.* NOTCH1 activation in breast cancer confers sensitivity to inhibition of SUMOylation. *Oncogene* **34**, 3780–3790 (2015).
 144. Weissman, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 169–178 (2001).
 145. Geiss-Friedlander, R. & Melchior, F. Concepts in sumoylation: A decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 947–956 (2007).
 146. Verger, A., Perdomo, J. & Crossley, M. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep.* **4**, 137–142 (2003).
 147. Melchior, F. Sumo — N Onclassical U Biquitin. *Yeast* 591–626 (2000).
 148. Yang, W., Sheng, H., Homi, H. M., Warner, D. S. & Paschen, W. Cerebral ischemia/stroke and small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation - A new target for therapeutic intervention? *J. Neurochem.* **106**, 989–999 (2008).
 149. Shao, R. *et al.* Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: Direct interaction with HIF-1 α in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS Lett.* **569**, 293–300 (2004).
 150. Johnson, E. S., Schwienhorst, I., Dohmen, R. J. & Blobel, G. The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J.* **16**, 5509–5519 (1997).

151. Desterro, J. M. P., Rodriguez, M. S., Kemp, G. D. & Ronald T, H. Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 10618–10624 (1999).
152. Müller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. SUMO , UBIQUITIN ' S MYSTERIOUS COUSIN. **2**, 202–210 (2001).
153. Gandia, C. *et al.* Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells* **26**, 638–645 (2008).
154. Cerrada, I. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha Contributes to Cardiac Healing in Mesenchymal Stem Cells-Mediated Cardiac Repair. *Stem Cells Dev.* **22**, 120914060720002 (2012).
155. Ciria, M. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Migration and Proliferation Are Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 α Upstream of Notch and SUMO Pathways. *Stem Cells Dev.* **26**, 973–985 (2017).
156. Tian, Q. *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α induces migration and invasion through Notch signaling. *Int. J. Oncol.* **47**, 728–738 (2015).
157. Bolós, V. *et al.* Notch activation stimulates migration of breast cancer cells and promotes tumor growth. *Breast Cancer Res.* **15**, R54 (2013).
158. Hashimoto-Torii, K., Torii, M. & Sarkisian, M. Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron* **60**, 273–284 (2008).
159. Carrero, R. *et al.* IL1 β Induces Mesenchymal Stem Cells Migration and Leucocyte Chemotaxis Through NF- κ B. *Stem Cell Rev. Reports* **8**, 905–916 (2012).
160. Ahner, A., Gong, X. & Frizzell, R. A. Divergent signaling via SUMO modification: potential for CFTR modulation. *Am. J. Physiol. Physiol.* **310**, C175–C180 (2016).
161. Zhou, X. L. & Liu, J. C. Role of Notch signaling in the mammalian heart. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **47**, 1–10 (2014).
162. Liu, J., Shen, J. X., Wen, X. F., Guo, Y. X. & Zhang, G. J. Targeting Notch degradation system provides promise for breast cancer therapeutics. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **104**, 21–29 (2016).
163. Sodhi, C. P., Batlle, D. & Sahai, A. Osteopontin mediates hypoxia-induced proliferation of cultured mesangial cells: Role of PKC and p38 MAPK. *Kidney Int.* **58**, 691–700 (2000).
164. Cejudo-Martin, P. & Johnson, R. S. A new Notch in the HIF belt: How hypoxia impacts differentiation. *Dev. Cell* **9**, 575–576 (2005).
165. Pear, W. S. & Simon, M. C. Lasting longer without oxygen: The influence of hypoxia on Notch signaling. *Cancer Cell* **8**, 435–437 (2005).

166. Lee, S. H., Lee, Y. J., Song, C. H., Ahn, Y. K. & Han, H. J. Role of FAK phosphorylation in hypoxia-induced MSCS migration: involvement of VEGF as well as MAPKS and eNOS pathways. *AJP Cell Physiol.* **298**, C847–C856 (2010).
167. Distler, J. H. W. *et al.* Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum.* **56**, 311–322 (2007).
168. Egger, M. *et al.* Hypoxia up-regulates the angiogenic cytokine secretoneurin via an HIF-1 - and basic FGF-dependent pathway in muscle cells. *FASEB J.* **21**, 2906–2917 (2007).
169. Winter, S. F. *et al.* Conditional activation of FGFR1 in the prostate epithelium induces angiogenesis with concomitant differential regulation of Ang-1 and Ang-2. *Oncogene* **26**, 4897–4907 (2007).
170. Nakamura, K., Tan, F., Li, Z. & Thiele, C. J. NGF activation of TrkA induces vascular endothelial growth factor expression via induction of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol. Cell. Neurosci.* **46**, 498–506 (2011).
171. Akeno, N., Robins, J., Zhang, M., Czyzyk-Krzeska, M. F. & Clemens, T. L. Induction of vascular endothelial growth factor by IGF-I in osteoblast-like cells is mediated by the PI3K signaling pathway through the hypoxia-inducible factor-2 alpha. *Endocrinology* **143**, 420–425 (2002).
172. Gaiano, N. Strange Bedfellows: Reelin and Notch Signaling Interact to Regulate Cell Migration in the Developing Neocortex. *Neuron* **60**, 189–191 (2008).
173. Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. & Hay, R. T. SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol. Cell* **2**, 233–239 (1998).
174. Berta, M. A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J. & Brahimi-Horn, M. C. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 α reduces its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 646–652 (2007).
175. Comerford, K. M. *et al.* Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 986–991 (2003).
176. Wilson, V. G. & Rangasamy, D. Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp. Cell Res.* **271**, 57–65 (2001).
177. Villa, J. C. *et al.* Nontranscriptional role of hif-1 α in activation of γ -secretase and notch signaling in breast cancer. *Cell Rep.* **8**, 1077–1092 (2014).
178. Cheng, Y. *et al.* Evidence that Collaboration between HIF-1 α and Notch-1 Promotes Neuronal Cell Death in Ischemic Stroke. *NIH Public Access* 1–18 (2015). doi:10.1016/j.nbd.2013.10.009.Evidence
179. Pistollato, F. *et al.* Interaction of HIF1 α and Notch Signaling Regulates Medulloblastoma Precursor Proliferation and Fate. *NIH Public Access* **28**, 1918–

- 1929 (2012).
180. Tempé, D. *et al.* SUMOylation of the inducible (c-Fos:c-Jun)/AP-1 transcription complex occurs on target promoters to limit transcriptional activation. *Oncogene* **33**, 921–927 (2014).
 181. Sutinen, P., Rahkama, V., Rytinki, M. & Palvimo, J. J. Nuclear Mobility and Activity of FOXA1 with Androgen Receptor Are Regulated by SUMOylation. *Mol. Endocrinol.* **28**, 1719–1728 (2014).
 182. Singh, S., Pradhan, A. K. & Chakraborty, S. SUMO1 negatively regulates the transcriptional activity of EVI1 and significantly increases its co-localization with EVI1 after treatment with arsenic trioxide. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**, 2357–2368 (2013).
 183. Zhang, L. J. *et al.* Coordinated regulation of transcription factor bcl11b activity in thymocytes by the Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) pathways and protein sumoylation. *J. Biol. Chem.* **287**, 26971–26988 (2012).
 184. Ledsaak, M. *et al.* PIAS1 binds p300 and behaves as a coactivator or corepressor of the transcription factor c-Myb dependent on SUMO-status. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1859**, 705–718 (2016).
 185. Rosonina, E., Akhter, A., Dou, Y., Babu, J. & Sri Theivakadadcham, V. S. Regulation of transcription factors by sumoylation. *Transcription* **8**, 220–231 (2017).
 186. Antila, C. J. M. *et al.* Sumoylation of Notch1 represses its target gene expression during cell stress. *Cell Death Differ.* 600–615 (2018). doi:10.1038/s41418-017-0002-6
 187. Gordon, W. R., Arnett, K. L. & Blacklow, S. C. The molecular logic of Notch signaling - a structural and biochemical perspective. *J. Cell Sci.* **121**, 3109–3119 (2008).
 188. Derogowski, V., Gaggero, E., Priest, L., Rydzziel, S. & Canalis, E. Role of the ram domain and ankyrin repeats on notch signaling and activity in cells of osteoblastic lineage. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 1317–1326 (2006).
 189. Wang, K. *et al.* PEST domain mutations in Notch receptors comprise an oncogenic driver segment in triple-negative breast cancer sensitive to a γ -secretase inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **21**, 1487–1496 (2015).
 190. Gill, G. Something about SUMO inhibits transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 536–541 (2005).
 191. Lin, D. Y. *et al.* Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors. *Mol. Cell* **24**, 341–354 (2006).
 192. Miranda, K. J., Loeser, R. F. & Yammani, R. R. Sumoylation and nuclear translocation of S100A4 regulate IL-1 β -mediated production of matrix

- metalloproteinase-13. *J. Biol. Chem.* **285**, 31517–31524 (2010).
193. Palczewska, M. *et al.* Sumoylation regulates nuclear localization of repressor DREAM. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 1050–1058 (2011).
 194. Sehat, B. *et al.* SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. *Sci. Signal.* **3**, (2010).
 195. Majumdar, A., Petrescu, A. D., Xiong, Y. & Noys, N. Nuclear translocation of cellular retinoic acid-binding protein II is regulated by retinoic acid-controlled SUMOylation. *J. Biol. Chem.* **286**, 42749–42757 (2011).
 196. Teruit, Y., Saad, N., Jia, S., McKeon, F. & Yuan, J. Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J. Biol. Chem.* **279**, 28257–28265 (2004).
 197. Mukherjee, T., Kim, W. S., Mandal, L. & Banerjee, U. Interaction between Notch and Hif- α in development and survival of *Drosophila* blood cells. *Science (80-.)*. **332**, 1210–1213 (2011).
 198. Hu, Y. Y. *et al.* Hif-1 α and Hif-2 α differentially regulate Notch signaling through competitive interaction with the intracellular domain of Notch receptors in glioma stem cells. *Cancer Lett.* **349**, 67–76 (2014).
 199. Ranganathan, P., Weaver, K. L. & Capobianco, A. J. Notch signalling in solid tumours: A little bit of everything but not all the time. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 338–351 (2011).
 200. Neve, R. M. *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* **10**, 515–527 (2006).
 201. Seeler, J. S. & Dejean, A. SUMO and the robustness of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 184–197 (2017).

