



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

TESIS

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL HDAC1 EN LA
EXPRESIÓN DEL VHL Y DEL VEGF EN EL QUERATINOCITO”**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

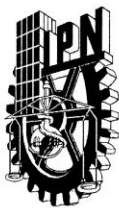
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

P R E S E N T A

M. EN C. ANGELICA REYNOSO ROLDAN



México, D.F. Noviembre, 2010.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D. F., siendo las 12:00 horas del día 22 del mes de noviembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Estudio de la actividad del HDAC1 en la expresión del VHL y del VEGF en el queratinocito

Presentada por el alumno:

Reynoso

Apellido paterno

Roldán

Apellido materno

Angélica

Nombre(s)

Con registro:

B	0	6	1	0	3	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Juan Carlos Cancino Díaz

Dr. Mario Eugenio Cancino Díaz

Dra. María Lilia Domínguez López

Dr. César Hugo Hernández Rodríguez

Dra. María de Lourdes Villa Tanaca

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Manuel Jesús Piñón López





HDAC1, LL-37, HIF-1alpha and VHL regulate the expression of VEGF in keratinocytes

Journal:	<i>International Journal of Dermatology</i>
Manuscript ID:	IJD-2010-1117
Manuscript Type:	Report
Date Submitted by the Author:	26-Aug-2010
Complete List of Authors:	Reynoso-Roldan, Angélica; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Inmunología Cancino-Díaz, Juan C; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Microbiología Rodríguez-Martínez, Sandra; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Inmunología Cancino-Díaz, Mario; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Inmunología
Keywords:	angiogenesis, psoriasis, biology

Este trabajo se desarrollo en el laboratorio de Inmunología Básica del departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de Dr. Juan Carlos Cancino Díaz y el Dr. Mario E. Cancino Díaz, con apoyo del proyecto CONACyT clave 60310 y el proyecto SIP clave 20090937.

El alumno fue apoyado por el programa Institucional de Formación de investigadores (PIFI) por el proyecto SIP 20090937 y agradece al CONACyT por la beca otorgada para su estudio de doctorado.

El programa de Doctorado en Ciencias Quimicobiologicas forma parte del PNP.

Contenido

Tabla de figuras	8
Abstract	9
Resumen	10
Introducción	11
Justificación	18
Hipótesis	21
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
Material y métodos	23
Clonación.	23
Ensayos de transfección.	23
Aislamiento del ARN y análisis por RT-PCR.	24
Tratamiento de células HaCaT con tricostatina A (TSA).	24
ELISA.	24
Análisis de inmunofluorescencia.	25
Resultados	27
HDAC1 regula la expresión de VEGF positivamente.	27
La expresión del VHL disminuye la expresión de VEGF en las células HaCaT.	32
LL-37 produce un exceso de VEGF en las células HaCaT.	34
Efecto de co-participación de HDAC1, LL-37 y VHL en la expresión de VEGF en las células HaCaT.	36
Efecto del HDAC1, LL-37 y VHL sobre HIF-1alfa en las células HaCaT.	39
Discusión	42
Conclusiones	45
Bibliografía.	46

Tabla de figuras

Figura 1. Mecanismo de regulación oxígeno-dependiente de HIF-1 y la estabilización de la transactivación. _____	17
Figura 2. Mapa del vector de expresión pcDNA3.1/V5-His-TOPO® _____	26
Figura 3. Amplificación de la secuencia codificante del HDAC1. _____	28
Figura 4. Autenticidad del inserto HDAC1 ligado al vector de clonación _____	29
Figura 5. Análisis de la orientación del inserto mediante digestión enzimática de ADN plasmídico _____	30
Figura 6. El HDAC1 incrementa la producción de VEGF en las células HaCat _____	31
Figura 7. VHL disminuye la expresión de VEGF en los queratinocitos. _____	33
Figura 8. LL-37 aumenta la expresión de VEGF en los queratinocitos. _____	35
Figura 9. Efecto de la co-transfección con pHDAC1/pLL-37 pHDAC1/pVHL ó pVHL/pLL-37 sobre la expresión de VEGF en los queratinocitos. _____	358
Figura 10. Expresión y localización de HIF-1 alfa en células HaCaT transfectadas con HDAC1, VHL ó LL-37. _____	41

Abstract

In the psoriatic skin the angiogenesis is activated and the keratinocyte plays an important role in the production of VEGF, nevertheless the mechanism to regulate VEGF expression in this cell remains unknown. In hypoxic tumoral tissues the expression of VEGF is regulated by HIF 1alpha. HIF-1alpha is ubiquitinated by VHL for its proteosomal-degradation and it can be inhibited by HDAC1 and LL-37 activity. Objective: Since VEGF, HDAC1, and LL-37 but not VHL, have been found over-expressed in the psoriatic skin, we studied the participation of these molecules in the regulation of VEGF expression in the keratinocyte. Methods: hdac1, vhl and ll-37 genes were cloned to transfect HaCaT cells. Inhibitors of HDAC1 (TSA and HDAC1- siRNA) were also assayed. RT-PCR and ELISA were developed to analyze the expression of VEGF in the transfected-cells. HIF-1alpha was also analyzed by immunofluorescence in these cells. Results: The production of VEGF was increased in HDAC1 and LL-37-transfected HaCaT cells ($p < 0.05$) meanwhile VEGF production decreased in HaCaT cells treated with TSA and HDAC1-siRNA, and in VHL-transfected HaCaT cells. The levels of expression of intracytoplasmic HIF-1alpha were high in pLL37-transfected cells but low in pVHL- and pHDAC1- transfected cells. HIF-1alpha was only detected into the nucleus of HDAC1-transfected cells. The expression of VEGF and HIF-1alpha was high in pHDAC1- and pLL-37-co-transfected cells, and both expressions decreased when pVHL was present. Discussion: The results of this study are consistent with those reported by other authors,, which showed that HDAC1 is able to inhibit the activity of proteins other than histones as the VHL in different cell lines, in this study we studied functional activity of HDAC1 in HaCat keratinocytes, VHL inhibitory activity leads to decreased expression of VEGF due to the blockade of proteasomal degradation of HIF-1 alpha. Conclusions: These data demonstrate that HDAC1, LL-37 and VHL modulate the expression of VEGF via HIF-1alpha in keratinocytes.

Resumen

En la piel psoriásica la angiogénesis es activada y los queratinocitos juegan un papel importante en la producción de VEGF, sin embargo, el mecanismo para regular la expresión de VEGF en este tipo celular se desconoce. En hipóxia, en los tejidos tumorales la expresión de VEGF está regulada por HIF-1 alfa. HIF-1 alfa es ubiquitinado por el VHL para su degradación proteosomal y este a su vez puede ser inhibido por la actividad de HDAC1 y LL-37. Objetivo: Dado que el VEGF, HDAC1, y LL-37 pero no el VHL, se han encontrado sobre-expresado en la piel psoriásica, se estudió la participación de estas moléculas en la regulación de la expresión de VEGF en los queratinocitos. Métodos: los genes de hdac1, vhl y ll-37 fueron clonados para transfectarlos en células HaCaT. Los inhibidores de HDAC1 (TSA y siRNA-HDAC1) se analizaron también. La RT-PCR y ELISA se realizaron para analizar la expresión de VEGF en las células transfectadas. HIF-1 alfa también fue analizado mediante inmunofluorescencia de estas células. Resultados: La producción de VEGF se incrementó en células HaCaT transfectadas con HDAC1 y LL-37 ($p < 0.05$) mientras que la producción de VEGF en las células HaCaT tratados con TSA y HDAC1-siRNA y en las células HaCaT transfectadas con VHL disminuyó. Los niveles de expresión de HIF-1 alfa intracitoplasmáticos fueron elevados en las células transfectadas con pLL37, pero disminuyeron en células transfectadas con pVHL y pHDAC1. HIF-1 alfa sólo se detectó en el núcleo de las células transfectadas con HDAC1. La expresión de VEGF y HIF-1 alfa fue alta en células co-transfectadas con pHDAC1 y pLL-37, y la expresión de ambas disminuyó cuando pVHL estaba presente. Discusión: Los resultados obtenidos son congruentes con los reportados por otros autores, donde se demostró que el HDAC1 es capaz de inhibir la actividad de otras proteínas diferentes a las histonas como el VHL en diferentes líneas celulares, en este estudio se estudió actividad funcional de HDAC1 en los queratinocitos HaCat, su actividad inhibitoria sobre VHL conduce a la disminución de la expresión de VEGF debido al bloqueo de la degradación proteosomal de HIF-1 alfa. Conclusiones: Estos datos demuestran que HDAC1, LL-37 y el VHL modulan la expresión de VEGF a través de HIF-1 alfa en los queratinocitos.

Introducción

La angiogénesis es un proceso complejo para la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes en los tejidos. Este proceso juega un papel importante en la exacerbación de algunas enfermedades como el cáncer, la artritis y la psoriasis. El proceso angiogénico puede ser activado por varias moléculas producidas por las células epiteliales, los fibroblastos y las células tumorales. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es el principal factor pro-angiogénico cuya producción está estrechamente regulada.

El gen de VEGF consta de ocho exones separados por 7 intrones, la región codificante es de aproximadamente 14 kb. Las formas activas del VEGF se sintetizan, ya sea como homodímeros (40-45 kDa), o como heterodímeros con otros miembros de la familia VEGF como PIGF por ejemplo. A partir de este gen se generan 5 isoformas por *splicing* alternativo, que tienen un tamaño de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos. El VEGF nativo (VEGF165) es una glicoproteína de 45 kDa, básica, homodimérica con varios puentes disulfuro intra e intercatenarios. Los dos monómeros se asocian de forma antiparalela, y su reducción implica la pérdida total de su actividad biológica, VEGF es sintetizado por diversos tipos de células normales y neoplásicas. Expresándose de manera ubicua [1].

En condiciones de normoxia, factores como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I y II (IGF-I/II) entre otros, están implicados en la inducción de la producción de VEGF en los queratinocitos [2].

En condiciones de hipoxia, el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1alfa) es un regulador clave responsable de la inducción de genes que facilitan la adaptación y supervivencia celular y es el principal elemento implicado en la expresión de VEGF en las células tumorales [3]. Por tanto es considerado como el mediador primario de la respuesta celular, local y sistémica a hipoxia. HIF-1 α tiene una estructura heterodimérica constituida por

las subunidades HIF-1alfa y HIF-1beta, pertenece a la familia de proteínas con capacidad de unión a DNA bHLH (*basic helix-loop-helix* PAS). A la fecha se han descrito tres genes *hHIF* en humanos: *hHIF-1α*, *hHIF-2α* (también conocido como EPAS1 y MOP2), y *hHIF-3α* [4].

La proteína de *hHIF-1α* consta de 826 aminoácidos y es de aproximadamente 120kD, la proteína *hHIF-2α* es de 874 aminoácidos y de 115 kD y la proteína de la isoforma mas larga de *hHIF-3α* (*hHIF-3α1*) comprende 668 aminoácidos y pesa 73kD. Las proteínas *hHIF-1α*, *hHIF-2α* y *hHIF-3α* poseen un dominio bHLH (*basic helix-loop-helix*), dos dominios de homología PAS A y PAS B (Per/ARNT/Sim), un dominio de degradación dependiente de oxígeno ODDD (*oxygen-dependent degradation domain*) y dos dominios de transactivación N-TAD y C-TAD (amino y carboxilo terminal respectivamente). La subunidad *hHIF-1β* (también llamado ARNT de aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) oscila entre 91 y 94 kD [5].

HIF-1 beta se expresa constitutivamente mientras que la subunidad HIF-1alfa se regula en función de los niveles disponibles de oxígeno. Además, *hHIF1β* puede dimerizar con otros miembros de la familia de proteínas bHLHPAS, como AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) y formar parte de otros complejos proteicos (Hoffman et al., 1991). Las tres isoformas de *hHIF-α* poseen dos señales de localización nuclear (NLS) tipo bipartito N-NLS y C-NLS que consiste de dos a cinco residuos básicos separados por una secuencia espaciadora larga. El C-NLS esta localizado entre N-TAD y C-TAD de *hHIF-1α* y *hHIF-2α* y antes del segundo motivo LXXLL de *hHIF-3α1*. El C-NLS es necesario para la localización nuclear de *hHIF-1α*, *hHIF-2α* y *hHIF-3α* [6].

En normoxia HIF-1alfa es hidroxilado, un residuo de prolina en el motivo conservado LAPYIXMD dentro del dominio ODDD (P564), y otro residuo de prolina fuera del ODDD (P402) son hidroxilados por las enzimas prolil hidroxilasas (PHD) que son dependientes de 2-oxoglucorato y oxígeno, una vez que el HIF-1alfa esta hidroxilado, es ubiquitinado para ser degradado en el

proteosoma. El proceso de hidroxilación de HIF-1alfa es requerido para el reconocimiento de este por el Von Hippel-Lindau (VHL) para la consiguiente degradación proteasomal de HIF-1alfa [7,8].

Así mismo la hidroxilación del residuo de asparagina 803 por parte del factor inhibidor de HIF-1alfa (FIH), que además de ser dependiente de 2-oxoglucurato también requiere la presencia de Fe^{2+} y ascorbato como cofactores, impide la interacción de HIF-1alfa con el complejo CBP/p300 que actúa como coactivador de la transcripción de los genes blanco de HIF-1alfa [8]. Además, la acetilación de HIF-1alfa en el residuo de lisina 532 por acción de la acetiltransferasa ARD1 mejora la interacción del VHL con el HIF-1alfa [10]. Asimismo, la fosforilación de HIF-1alfa por acción de las MAPKs p42/44 y p38 estimula la actividad transcripcional de HIF-1alfa en condiciones de hipoxia (Figura 1) [11].

El VHL es un supresor del tumor, el gen *VHL* esta constituido por 3 exones que codifican una proteína (pVHL) de 213 aminoácidos y de aproximadamente 30 kD. El gen es conservado de manera evolutiva y codifica dos transcritos de aproximadamente 6 y 6.5 kilobases. La falta de su expresión se asocia con una variedad de tumores, incluyendo hemangioblastomas de la retina y del sistema nervioso central [12].

El producto del gen VHL, consiste estructuralmente de dos dominios macromoleculares: el dominio alfa localizado en la región carboxilo terminal y el dominio beta que se encuentra en la región amino terminal, ambos dominios tienen afinidad de unión a diferentes proteínas. La pVHL se localiza principalmente en el citoplasma aunque ocasionalmente se puede observar también en el núcleo [12].

En condiciones de normoxia, el dominio alfa de pVHL, que a su vez está formado por tres hélices alfa, se une directamente a la hélice alfa de la elonguina C y genera un grupo de cuatro hélices alfa intermolecular. La elonguina B se une al pVHL a través de la elonguina C, formando un complejo trimérico que a su vez se une a la proteína Cul2. Posteriormente, el complejo pVHL/elonguinaBC/Cul2 interactúa con una última molécula proteica

que es la Rbx1 (también llamada Hrt1 o ROC1), lo que genera el complejo VHL^{CBC} ó complejo VEC E3 ubiquitina ligasa, paralelamente el dominio beta del pVHL se une directamente al HIF-1 α , marcándolo para su degradación en el proteosoma [13]. En condiciones de hipoxia, el VHL está regulado por proteínas del tipo de las desacetilasas de histonas (HDACs) [14]. Las HDACs carecen de actividad intrínseca de unión al ADN pero son recrutadas a genes blanco a través de su asociación directa con activadores transcripcionales y represores, así mismo la incorporación en complejos multiproteicos produce la activación o la represión de los factores de transcripción [15].

Las proteínas HDACs son expresadas de manera ubicua, se localizan predominantemente en el núcleo, y presentan actividad enzimática hacia los sustratos de las histonas [16]. Estas proteínas catalizan la eliminación de grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas y proteínas no histonas, lo que resulta en la represión de la transcripción.

Existen tres clases conocidas de HDACs en el humano, clasificadas en base a su homología estructural con las HDACs descritas primariamente en levadura. La clase I (semejante a Rpd3), clase II (similar a Hda1) y clase III (similar Sir2/Hst) los miembros de este ultimo grupo son evolutivamente diferentes. Las enzimas de las clases I y II (HDAC1-11), también conocidas como la familia clásica de las HDACs, comparten un núcleo desacetilasa, una región de aproximadamente 390 aminoácidos que contiene un sitio catalítico. Este sitio es conservado en células eucariontes y esta constituido por un saco tubular con paredes hidrofóbicas y un catión de Zn (II) al fondo de esta estructura [17,18].

La expresión de la clase II de las HDACs es en general tejido dependiente. Este grupo de proteínas se puede subdividir en enzimas de clase IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 y HDAC9 isoformas a y b) y enzimas clase IIb (HDAC6 y HDAC10). Las HDACs clase IIa comparten la región amino-terminal que tiene dominios para interacción para factores de transcripción. Además poseen un sistema de lanzadera entre el citoplasma y el núcleo. Las enzimas de la clase IIb tienen dominios catalíticos duplicados y ambos son

principalmente citoplasmáticos. Estas enzimas solo se translocan al núcleo en respuesta a ciertos estímulos [19].

Las HDACs humanas agrupadas en la clase III a diferencia de las HDACs de las clases I y II, son dependientes de NAD⁺ y los subproductos de reacción son nicotinamida y O-acetil-ADP-ribosa. En este grupo clasificado siete proteínas (Sirt1-7), la actividad biológica de la mayoría de ellas aun no esta bien descrita. [20-22].

La HDAC1 es un polipéptido de 55 KDa que tiene una homología de 60% con la secuencia de la proteína RPD3 de levaduras. Particularmente forma parte del complejo Sin3 de mamíferos, el cual puede interaccionar con proteínas que se unen al DNA y tiene un papel funcional en la regulación transcripcional. El dominio catalítico de la región amino terminal de la HDAC1 conforma la mayor parte de la proteína [23].

La inhibición de la actividad global de las HDAC inhibe la angiogénesis y el crecimiento tumoral mediante la reducción de la expresión de factores proangiogénicos [24-26]. En particular, los niveles de HDAC1 incrementan en condiciones de hipoxia lo que conduce a su vez a la disminución de los niveles de VHL y de P53, esto genera la acumulación de HIF-1alfa y el aumento en la producción de VEGF en las células endoteliales humanas induciendo la angiogénesis [14].

En la piel psoriásica se producen alteraciones en la proliferación de los queratinocitos, procesos como la inflamación y la angiogénesis también participan en esta patología. Es bien sabido que los queratinocitos producen el VEGF; sin embargo la forma en que la expresión de este factor está regulada en esta célula, aún se desconoce. La importancia del VEGF en la psoriasis necesito ser determinada a partir de ratones transgénicos K14-VEGF (los queratinocitos producen un exceso de VEGF) que originan una piel parecida a la psoriásica con la mayoría de las características de la psoriasis humana [27]. Por otro lado, nuestro grupo ha informado que no el VHL pero sí el HDAC1, el HIF-1alfa, el LL-37 y el VEGF son sobre-expresados en las lesiones de la piel

psoriásica [28], lo que sugiere que estas moléculas están implicadas en la angiogénesis psoriásica. En este trabajo células HaCaT fueron transfectadas con el cDNA de la secuencia codificadora para el HDAC1, el LL-37 y el VHL para observar la participación de estas moléculas en la regulación de la expresión de VEGF en estas células.

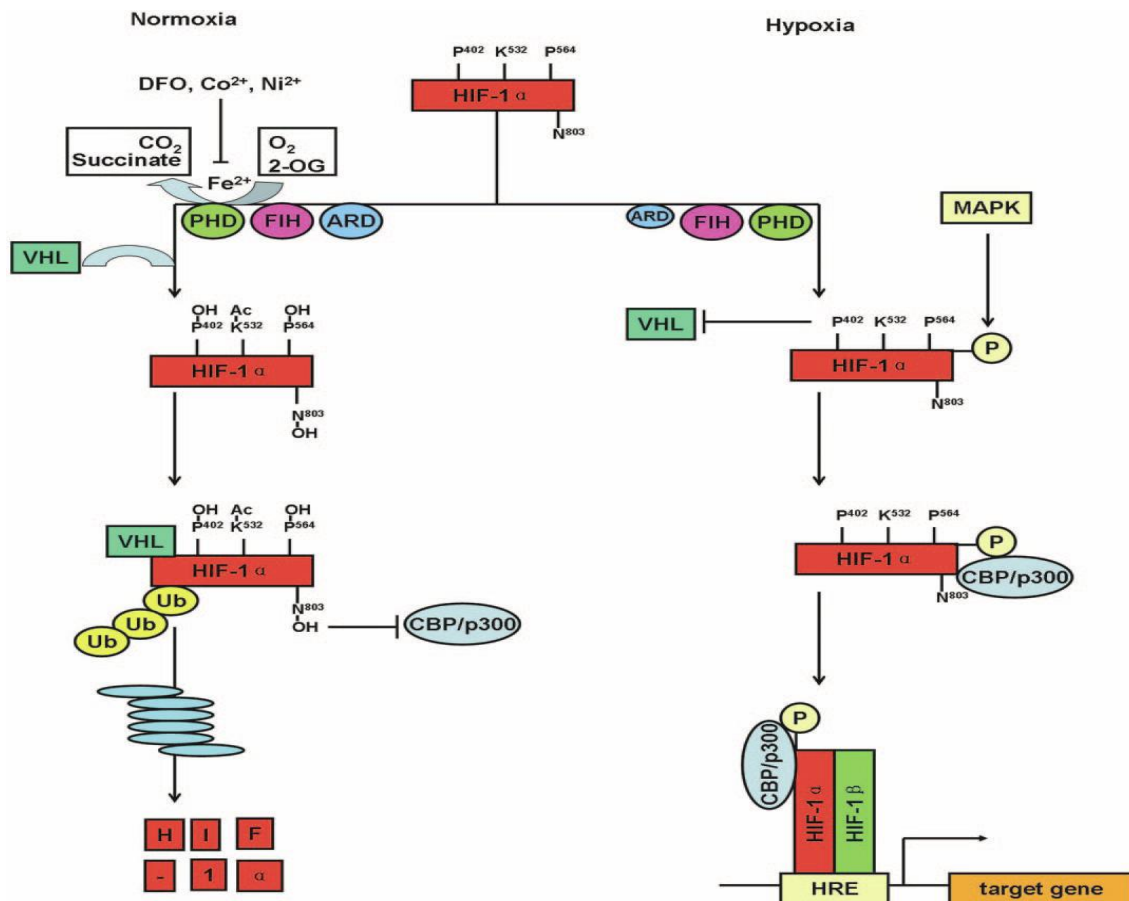


Figura 1. Mecanismo de regulación oxígeno-dependiente de HIF-1 y la estabilización de la transactivación.

En normoxia (izquierda), dos residuos de prolina (P₄₀₂ y P₅₆₄) y uno de asparagina (N₈₀₃) de HIF-1alfa son hidroxilados por las PDHs y FIH-1 respectivamente. HIF-1alfa hidroxilado se une al complejo VHL, que conduce a su degradación por el proteosoma. La acetilación de la lisina (K₅₃₂) por ARD1 favorece la interacción de HIF-1alfa con el VHL. N₈₀₃ hidroxilado bloquea la interacción del coactivador transcripcional CBP/p300 a HIF-1alfa. En hipoxia (la derecha), las actividades de las PHDs y de FIH-1 son inhibidas por la falta de O₂. Por lo tanto, HIF-1alfa se estabiliza y se transloca al núcleo para unirse a HIF-1beta. HIF-1beta se une preferentemente a la forma fosforilada de HIF-1alfa inducida por MAPK. La N₈₀₃ de HIF-1alfa no hidroxilada permite el reclutamiento de CBP/p300 a los genes blanco, dando lugar a la transcripción de genes. Además, la expresión de ARD1 se reduce en condiciones de hipoxia, produciendo una menor acetilación de HIF-1alfa.

Justificación

La transformación angiogénica del endotelio es un proceso muy complejo que implica la activación de muy diversas vías de señalización intercelulares. Cuando las células endoteliales en reposo se activan por el estímulo angiogénico, son inducidas a producir proteasas que les permiten degradar la matriz extracelular, migrar, proliferar, evitar la apoptosis inducida por la pérdida de las señales de supervivencia y, finalmente, diferenciarse para formar nuevos vasos sanguíneos [29].

La angiogénesis ocurre de forma reactiva al daño tisular, e induce a la hipoxia local, elemento que se comporta, de forma lógica, como un potente estímulo angiogénico [30]. Además de la hipoxia local, existen una serie de compuestos bioquímicos capaces de estimular la angiogénesis: IL-1, IL-6 e IL-8, metaloproteinasas, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor estimulador de colonias de monocitos (M-CSF), el factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF), la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), el factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), TGF- β , leucotrieno B₄, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), monóxido de nitrógeno (NO), IFN- γ y factores de crecimiento angiogénicos (α/β -FGF, VEGF) [31]. Se sabe que el péptido PR39, se comporta también como un inductor de respuesta angiogénica al prevenir la degradación por el proteosoma de HIF-1 alfa [32].

La hipoxia es el principal regulador de la expresión de VEGF tanto *in vitro* como *in vivo*, vía la ruta de supresión del gene supresor del tumor VHL-HIF-1alfa [32]. El VEGF es por lo tanto mayormente expresado en áreas necróticas adyacentes. La regulación de VEGF por la hipoxia se produce por la activación de la transcripción, y por mecanismos post-transcripcionales. En primer lugar, la disminución de la tensión de oxígeno causa un aumento de la transcripción del gen de VEGF a través del factor de transcripción HIF1alfa. En situación de hipoxia, HIF1 α es estabilizado y se une a un elemento de respuesta a hipoxia situado a 1 kb *upstream* del sitio de inicio de transcripción [34]. Una vez sintetizado el RNA mensajero de VEGF, este se une a la proteína

HuR y otras proteínas que inhiben la degradación del transcrito en condiciones de hipoxia [35]. El transporte de VEGF del retículo endoplasmático al complejo de Golgi está controlado por la chaperona ORP150, que es también inducible por hipoxia [36].

Las subunidades HIF-1alfa son lábiles bajo normoxia y son degradadas después del proceso de poliubiquitinación por parte del complejo E3 ubiquitina ligasa, el dominio mínimo que confiere inestabilidad a HIF-1 alfa ha sido puntualizado y nombrado apropiadamente como ODDD (oxygen-dependent degradation domain). El dominio beta de pVHL del complejo E3 ubiquitina ligasa reconoce de manera específica los residuos prolil-hidroxilados de los dominios ODDD, que es la señal molecular para iniciar su actividad de ubiquitinación sobre el HIF-1alfa marcándolo así su degradación por la vía proteasomal [37-40].

La interacción VHL/HIF-1 alfa en ratones deficientes ó con mutaciones en el gene VHL da por resultado un incremento en la vascularización y la generación de tumores [41]. Se han descrito mecanismos que afectan la inducción de la expresión de HIF-1alfa, como la actividad de ciertas citocinas, factores de crecimiento y mutaciones oncogénicas en condiciones de normoxia, que explican la presencia de la proteína HIF-1alfa en áreas no hipóxicas de tumores que pueden contribuir al desarrollo de angiogénesis tumoral temprana antes del inicio de la hipoxia [42-44]. Por otro lado se han propuesto mecanismos involucrados en el incremento de la traducción del mRNA de HIF-1alfa ó la inducción de modificaciones post-traduccionales como son el proceso de fosforilación o la acetilación que puede afectar la estabilidad de la proteína HIF-1 alfa [45]. En el 2002 se reportó que la acetilación del residuo K532 del HIF-1alfa se lleva a cabo por la enzima acetil transferasa ARD1 lo cual propuso un nuevo mecanismo de control de la estabilidad del HIF-1alfa [9]. Yoo y colaboradores demostraron que la proteína asociada a metástasis (MTA1) promueve la desacetilación de HIF-1 alfa debido al incremento de la expresión de HDAC1 [46].

Kim informó que la TSA induce la expresión de p53 y de VHL bajo condiciones de hipoxia, mientras que la expresión de VEGF y de HIF-1alfa es

reducida. Proporcionalmente, la expresión de p53 y VHL disminuyó por sobreexpresión de HDAC1, pero la expresión de HIF-1 α y VEGF se incrementaron. En este mismo estudio se observó que HDAC1 estimula la angiogénesis tanto in vivo como in vitro, sugiriendo una actividad significativa para HDAC1 en angiogénesis inducida por hipoxia. En base en estos estudios, parece probable que HDAC1 está implicada en la regulación de la estabilidad de HIF-1 α a través del proceso reversible de la acetilación [14].

Muchos tipos de tumores sobre-expresan el VEGF, pero la actividad del VHL, o las rutas bioquímicas de cómo están participando en la regulación del VEGF en algunos tipos celulares como en los queratinocitos humanos no está aun caracterizado. El estudio realizado por Tovar et al., en 2004 sobre el análisis comparativo de la expresión de VHL y genes pro-angiogénico como HDAC1, HIF-1 α y LL-37 en biopsias de lesiones psoriásicas, demuestran de manera particular una expresión del gen HDAC1 en estas muestras, contrariamente, en las muestras de individuos sanos no se manifiesta la expresión de este gen. Los resultados en cuanto a la expresión del VHL son antagonistas a los observados con HDAC1 [28]. Por lo que en este trabajo se estudió y analizó la expresión de VEGF en base al posible papel regulatorio de HDAC1 para así determinar en parte un mecanismo de regulación de VEGF y genes relacionados en su expresión en el queratinocito humano.

Hipótesis

Como el producto que codifica el gen *hdac1* presenta actividad angiogénica, entonces inducirá la expresión de VEGF en el modelo de queratinocitos humanos cultivados in vitro, esta inducción estará mediada por la actividad de HIF-1 α en condiciones de normoxia. Así mismo se inhibirá la actividad de VHL y como consecuencia no habrá degradación proteasomal de HIF-1 α .

Objetivo general

- ANALIZAR LA ACTIVIDAD DEL HDAC1 EN LA EXPRESION DEL VEGF EN EL QUERATINOCITO.

Objetivos específicos

- ◆ Clonar el gen *hdac1* a partir de queratinocitos humanos HaCat, y verificar la inserción y la orientación del inserto en el vector de clonación, con la finalidad de obtener células HaCat transfectadas con este gen, para estudios posteriores.
- ◆ Observar en las células HaCat transfectadas con los plásmidos pHDAC1, pVHL y pLL-37 el efecto sobre la regulación de la expresión de VEGF.
- ◆ Determinar el efecto del inhibidor de HDAC1 (tricostatina) y el efecto del silenciamiento de este gen sobre la expresión de VEGF en células HaCat no transfectadas con el gen HDAC1..

Material y métodos

Clonación.

El DNA que codifica la secuencia de HDAC1 fue amplificado por RT-PCR a partir de células HaCat utilizando un par de iniciadores específicos, el iniciador sentido 5'- atggcgcagacgcagggcaccg 3' está localizado entre la posición 64 pb – 87 pb de la secuencia del RNA mensajero del HDAC1; y el antisentido (5' ggaggagggtcaagtggcctga 3' entre la posición 1490 pb- 1512 pb de la misma secuencia, el amplificado tiene un tamaño esperado de 1449 pb. La clonación se llevó a cabo en el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, Carlsbad CA, EE.UU.)(Figura 1). El plásmido generado fue nombrado pHDAC1. Posterior a la reacción de ligazón y la transformación de las bacterias *E. coli* con este plásmido, se aislaron las colonias recombinantes que fueron analizadas por PCR para verificar si cada una de las clonas contenían el inserto ligado al vector. Los productos esperados tienen un tamaño aproximado de 352 pb dado que se utilizó para esta amplificación un juego de iniciadores internos específicos para HDAC1 (forward 5'-ggcgggtggttacaccattcgta 3' y reverse 5'-tctgacaaacgaattgcctgtg 3'). Para la verificación de la orientación del inserto en el vector se realizó una digestión enzimática de DNA plásmidico tratado con las enzimas EcoRV y Sal1, los productos esperados tienen un tamaño de 6315 pb, 483 pb, 174 pb y de 4696 pb, 2242 pb respectivamente para cada tratamiento enzimático.

Ensayos de transfección.

Las células HaCaT se cultivaron en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Rockville, MD, EE.UU.) en placas de 6 pozos hasta alcanzar una confluencia del 80%. Las células fueron transfectadas con lipofectamine 2000 (Invitrogen) según lo indicado por el proveedor. Los sobrenadantes de cultivo celular fueron obtenidos y almacenados a 70°C hasta su uso, y las células transfectadas fueron tratadas con Trizol (Invitrogen) para el análisis de la expresión del mRNA. Para los ensayos con RNA pequeño de interferencia (siRNA), se utilizaron 250, 500 y

1000 ng / mL de HDAC1-siRNA y 500 ng / mL de control de siRNA (c-siRNA, Santa Cruz, Santa Cruz CA, EE.UU.) para transfectar células HaCat con los plásmidos HDAC1, y los obtenidos previamente pLL-37 y pVHL.

Aislamiento del ARN y análisis por RT-PCR.

La extracción de RNA total se realizó con el reactivo Trizol. Para la reacción de transcriptasa inversa (RT), el RNA total (3 µg) con 0,5 µl de oligo-(dT)₁₅₋₁₈ (Invitrogen) se desnaturalizaron en 70°C durante 10 min. La mezcla maestra para la síntesis de la primera cadena se preparó con regulador 1X, 0,5 mM DTT, 500 µM de cada dNTP (Invitrogen) y 200U de la transcriptasa inversa MMLV (Invitrogen). Las reacciones de RT se efectuaron en 42°C por 1 h. Las reacciones de PCR se realizaron con 1U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 1µl del cDNA, buffer 1X, 1 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTPs y 0,2 µM de cada cebador específico correspondiente [15]. Condiciones óptimas de PCR fueron: 30 ciclos de 30 s a 92°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C.

Tratamiento de células HaCaT con tricostatina A (TSA).

Para analizar el papel de HDAC1 en la expresión de VEGF, células HaCaT fueron tratadas con TSA para inhibir la actividad de HDAC1. Las células HaCaT se cultivaron en placas de 6 pocillos con DMEM complementado hasta lograr el 85% de confluencia. Las células fueron tratadas con 30, 90, 150, 240 y 480 ng / mL de TSA (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 24 horas. Los sobrenadantes fueron mantenidos para medir la producción de VEGF por ELISA.

ELISA.

La ELISA se llevó a cabo para cuantificar el VEGF (Human VEGF CytoSet™ kit, Invitrogene Biosource)) en el sobrenadante de los queratinocitos transfectados y no transfectados. Brevemente, los pozos de poliestireno se

recubrieron con el anticuerpo anti-VEGF monoclonal humano diluido en tampón carbonato y se incubó a 4°C toda la noche. Después se bloqueó con 3% de leche descremada, 100 µl de sobrenadantes de cultivos se añadió en cada pocillo y se incubó durante 1 h. Después del lavado, los pocillos se incubaron con el segundo anticuerpo de conejo anti-humano-VEGF conjugado con biotina, la peroxidasa conjugada con estreptavidina se utilizó para desarrollar el color con H₂O₂ y o-fenileno-diamina como sustrato. La absorbancia se midió a 492 nm.

Análisis de inmunofluorescencia.

Las células HaCaT fueron cultivadas y tratadas sobre cubreobjetos. Las células se fijaron con metanol absoluto frío durante 10 min y se lavó con TBS. Los cubreobjetos fueron tratados con solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 3%) durante 1h. Las células se incubaron con el primer anticuerpo específico para HIF-1alfa, VEGF, VHL, LL-37 ó IgG de conejo como control (Santa Cruz) durante 1 h a 37°C. El conjugado FITC de cabra anti-conejo IgG o Alexa Fluor-488 de cabra anti conejo IgG se utilizaron como anticuerpo secundario para observar la expresión de las proteínas mediante microscopia de fluorescencia.

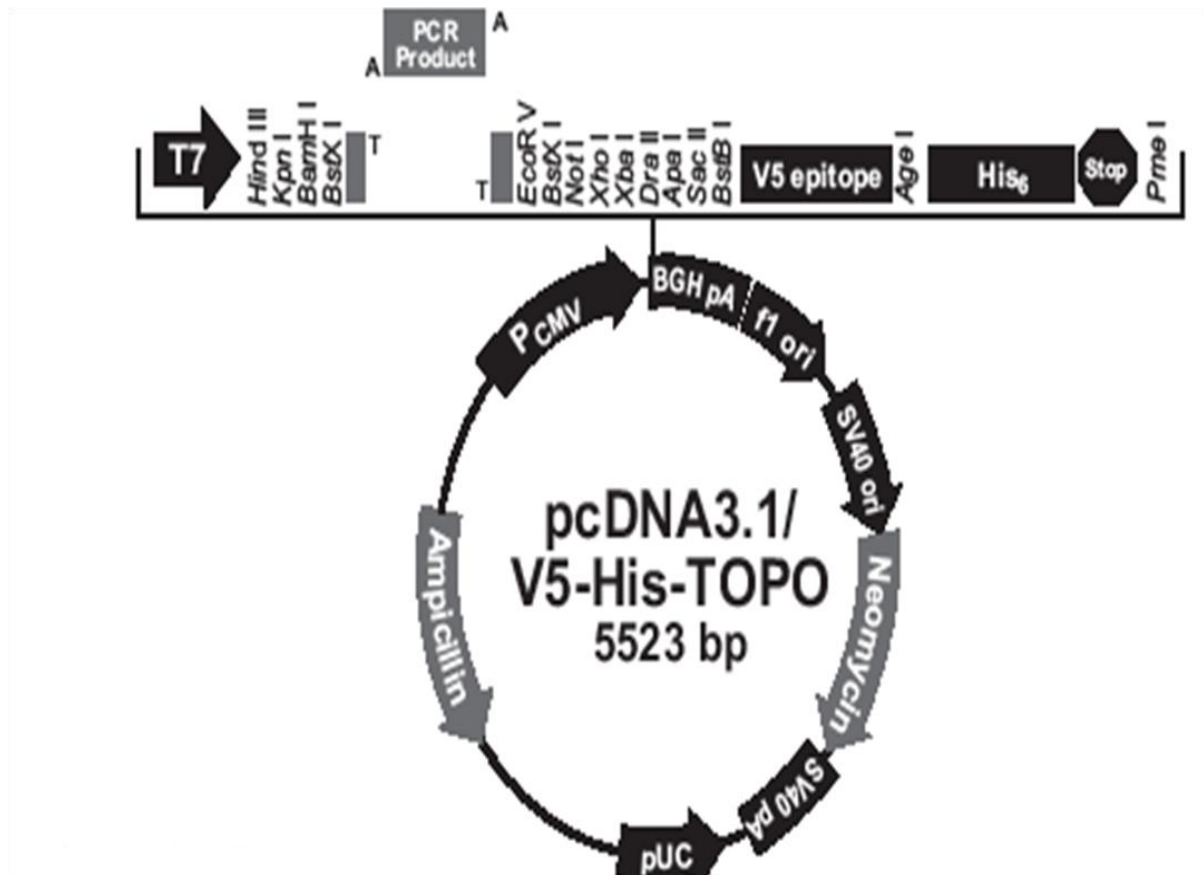


Figura 2. Mapa del vector de expresión pcDNA3.1/V5-His-TOPO®

Se muestra el sitio de clonación para la generación del plásmido pHDAC1.

Resultados

HDAC1 regula la expresión de VEGF positivamente.

La verificación del fragmento amplificado HDAC1 para la clonación se analizó mediante un gel de agarosa al 1.5%, donde el tamaño de las bandas corresponden al producto esperado (Figura 3). La autenticidad y la correcta orientación del inserto en el vector de clonación se demostraron satisfactoriamente mediante electroforesis de geles de agarosa posterior a la reacción de PCR y la digestión enzimática respectivamente (Figuras 4 y 5).

Células HaCaT fueron transfectadas con pHDAC1 para analizar si HDAC1 está regulando la expresión de VEGF. Las células transfectadas con pHDAC1 expresaron cantidades más altas del ARNm- HDAC1 en comparación con las células transfectadas con el vector vacío pcDNA3.1-TOPO (control de vectores; fig. 6 panel a). Cuando la producción de VEGF se analizó en las células HaCaT transfectadas con pHDAC1 encontramos que se produce en exceso de manera dependiente del tiempo, con la mayor producción a las 72 horas posteriores al tratamiento ($p < 0,05$; fig. 6 panel b). La alta producción de VEGF intracelular también se encontró a las 72 horas de tratamiento analizadas mediante inmunofluorescencia (fig. 6, panel c). Para corroborar el papel de HDAC1 sobre la expresión de VEGF, tricostatina A (TSA) fue utilizado para inhibir la actividad de HDACs. Las células HaCaT tratadas con TSA disminuyeron la producción de VEGF de manera dosis-dependiente ($p < 0,05$; fig. 6, el panel d). Las células HaCaT tratadas con siRNA-HDAC1 (250-1000 nM) disminuyeron la expresión de mRNA-HDAC1 en comparación con las células tratadas con c-siRNA (fig. 6, panel e). Como se esperaba, las células HaCaT transfectadas con siRNA-HDAC1 produjeron cantidades pequeñas de VEGF, como ocurrió en las células tratadas con TSA-A en comparación con las células tratadas con c-siRNA ($p < 0.05$; Fig.6 panel f). Estos resultados indican que HDAC1 regula positivamente la expresión de VEGF en los queratinocitos.

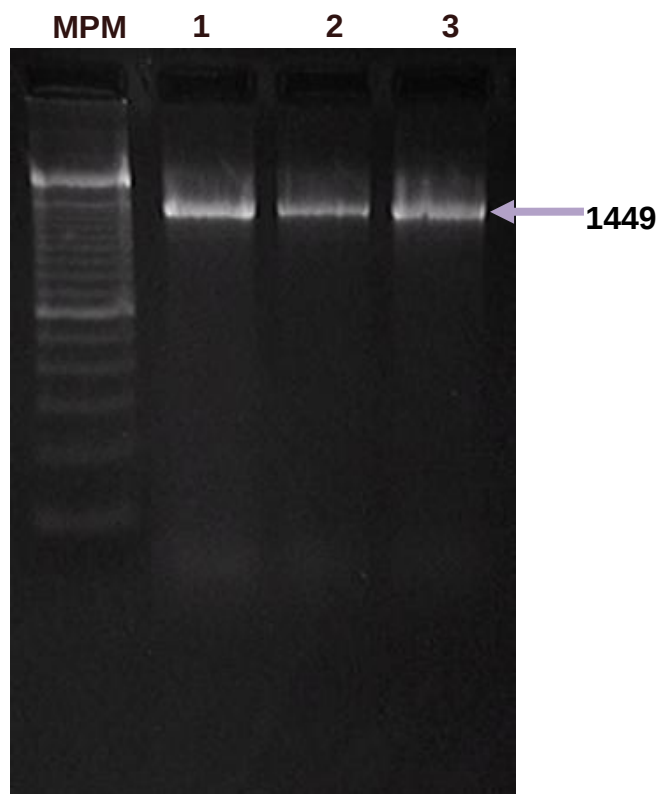


Figura 3. Amplificación de la secuencia codificante del HDAC1. Se muestra la amplificación de HDAC1 por RT-PCR en los carriles 1-3 se observan las bandas de un tamaño aproximado de 1449pb, MPM marcador de pesos moleculares.

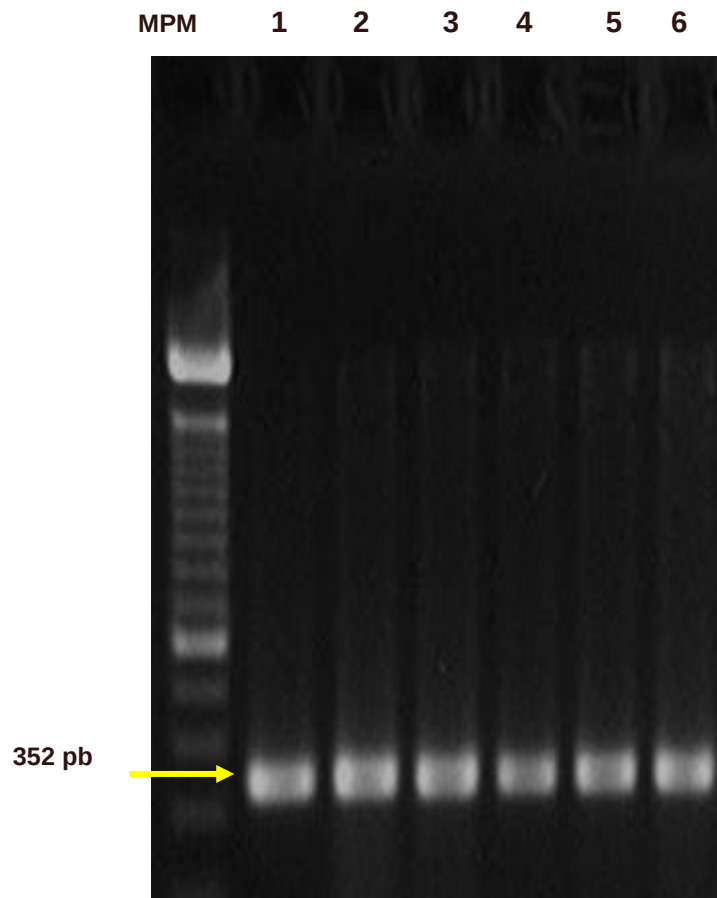


Figura 4. Autenticidad del inserto HDAC1 ligado al vector de clonación.

Se observa la amplificación de HDAC1 por RT-PCR de los carriles 1-6, las bandas son aproximadamente 352pb, MPM marcador de pesos moleculares

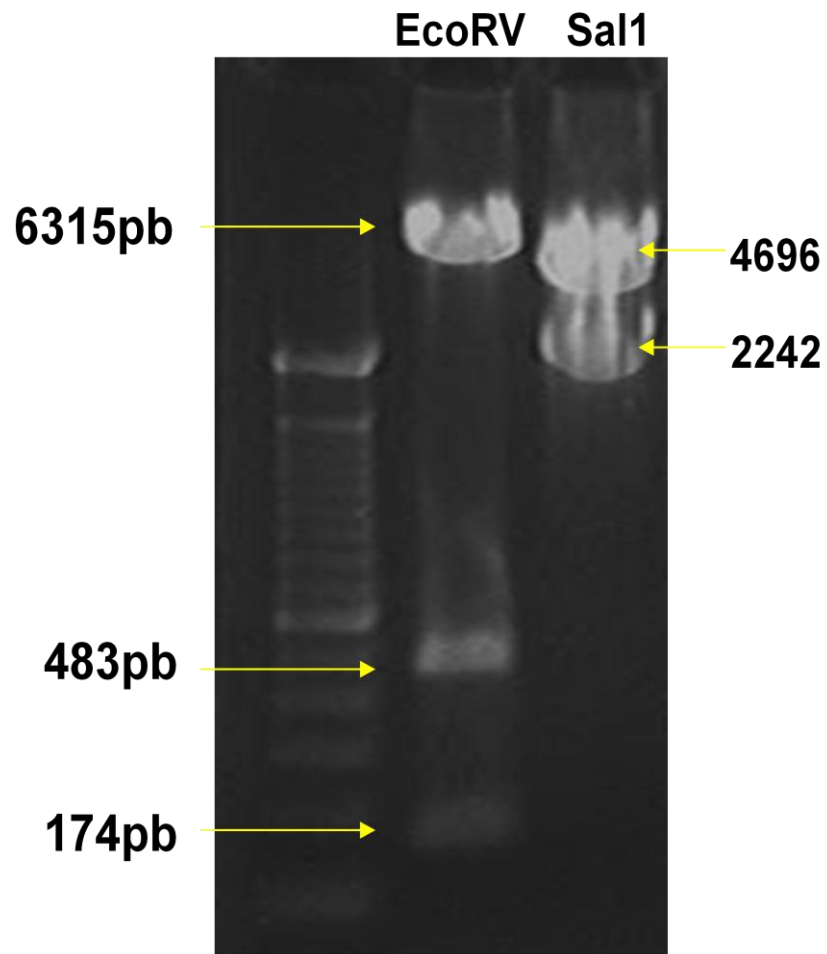


Figura 5. Análisis de la orientación del inserto mediante digestión enzimática de ADN plasmídico. Se muestra el patrón de corte esperado para cada uno de los tratamientos enzimáticos; EcoRV 3 bandas de 6315 pb, 483pb y 174 pb. SalI se observan dos bandas de 4696 pb y 2242 pb.

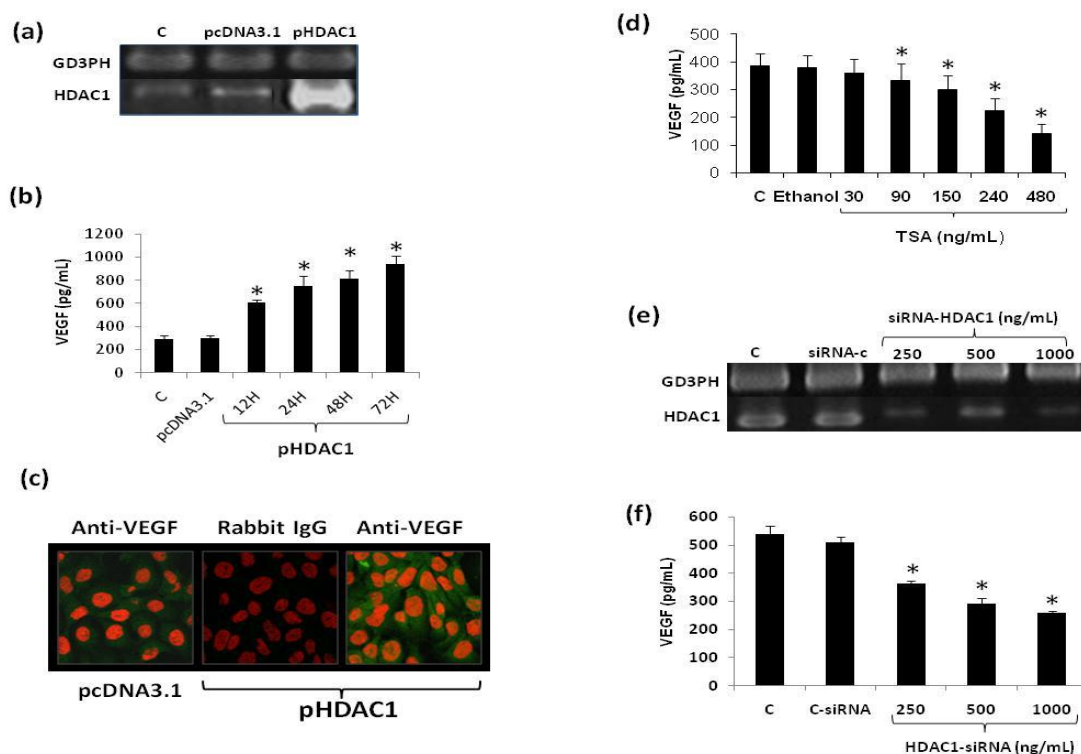
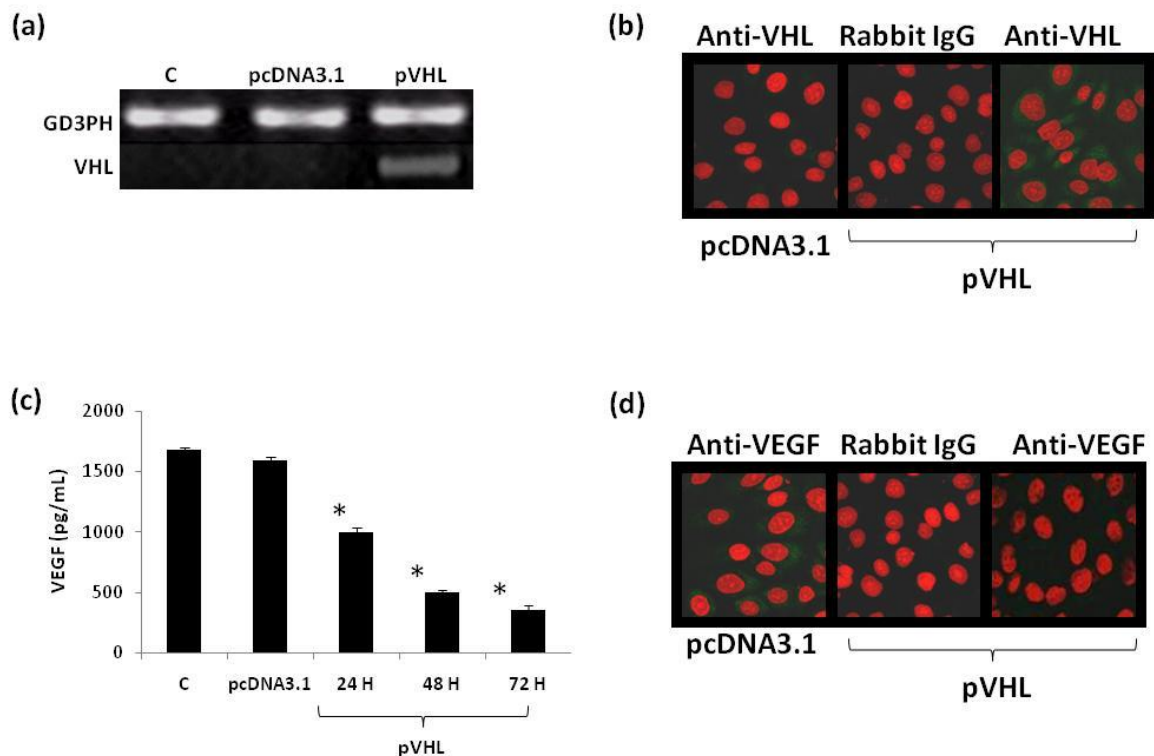


Figura 6. El HDAC 1 incrementa la producción de VEGF en células HaCat.

Panel (a): Células HaCat fueron transfectadas con 0.4 μ g de vector control (pcDNA3.1) ó con 0.4 μ g de pHDAC1, y se realizó la RT-PCR para analizar la expresión del mRNA-HDAC1; la expresión de GD3PH fue utilizada como un control de carga. C= células no transfectadas. **Panel (b):** El VEGF extracelular fue cuantificado por ELISA de células transfectadas con 0.4 μ g de pHDAC1 a diferentes tiempos de transfección. **Panel (c):** Immunofluorescencia de VEGF intracelular en células transfectadas con 0.4 μ g de pHDAC1. La IgG de conejo fue usada como control. **Panel (d):** Producción de VEGF (cuantificada por ELISA) después del tratamiento de células con diferentes concentraciones de TSA (inhibidor de HDAC1; el etanol fue probado, en este reactivo se disolvió la TSA); C= células no tratadas. Análisis de la expresión del mRNA-HDAC1 por RT-PCR (**Panel e**) y la producción de VEGF por ELISA (**Panel f**) de células transfectadas con diferentes concentraciones de siRNA para HDAC1 (HDAC1-siRNA) y siRNA control (c-siRNA). Se realizó la prueba estadística ANOVA; (*) indica diferencia estadística entre células no transfectadas (C) y células transfectadas.

La expresión del VHL disminuye la expresión de VEGF en las células HaCaT.

El VHL es un supresor de tumores que regula negativamente la expresión de VEGF en las células tumorales [10]. También los queratinocitos producen VEGF, pero no se sabe si el VHL participa en la regulación de la expresión de VEGF en este tipo celular. Para averiguarlo, las células HaCaT fueron transfectadas con pVHL. Como era de esperar, las células HaCaT transfectadas con pVHL mostraron alta expresión del mRNA-VHL en comparación con las células transfectadas con el vector control (Fig. 7, panel A). Analizando la expresión del VHL por inmunofluorescencia, resultados similares fueron encontrados (Fig. 7, panel b). Cuando se analizó la producción de VEGF en las células HaCaT transfectadas con pVHL, se observó que disminuyó de forma dependiente del tiempo, y después de 72 post-transfección la producción de VEGF se redujo en alrededor de cinco veces (Fig. 7, panel c). Con el fin de confirmar la disminución de VEGF, el VEGF intracelular se determinó mediante inmunofluorescencia y de nuevo se encontró su disminución en el citoplasma (Fig. 7, panel d). Estos resultados demuestran que la expresión de VEGF esta regulada negativamente por el VHL en los queratinocitos.



Figuran 7. VHL disminuye la expresión de VEGF en los queratinocitos.

Panel (a): Células HaCaT fueron transfectadas con 0.4 μ g de pcDNA3.1 (vector control) ó 0.4 μ g de pVHL. La RT-PCR se llevó a cabo para analizar la expresión del mRNA-VHL; la expresión de GD3PH fue utilizada como un control de carga. C = no transfectadas células. **Panel (b):** inmunofluorescencia para VHL intracelular utilizando un anticuerpo anti-VHL en las células HaCaT transfectadas con 0,4 μ g de pVHL. **Panel (c):** ELISA para VEGF extracelular en los sobrenadantes de las células HaCaT transfectadas con 0,4 μ g de pVHL en diferentes tiempos de transfección. **Panel (d):** inmunofluorescencia para VEGF intracelular utilizando un anticuerpo anti-VEGF en las células HaCaT transfectadas con 0,4 μ g de pVHL. La IgG de conejo se utilizó como control en los ensayos de inmunofluorescencia. Se realizó la prueba estadística ANOVA; (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las células no transfectadas (C) y transfectadas.

LL-37 produce un exceso de VEGF en las células HaCaT.

Se ha reportado de que la catelicidina porcina PR39 aumenta la producción de VEGF en las células endoteliales transfectadas con este gen [22]. Con el fin de estudiar si la catelicidina humana conocida como LL-37 muestra la misma actividad en los queratinocitos, transfectamos el gene LL-37 en células HaCaT. En los resultados obtenidos se observó una alta expresión del mRNA-LL-37 en las células HaCaT transfectadas con el LL-37, pero no en las células transfectadas HaCaT con el vector vacío como control (Fig. 8, panel a), este péptido antimicrobiano también se encontró en alta concentración en el citoplasma de las células HaCaT transfectadas con el LL-37 (Fig. 8, panel b). La producción de VEGF se incrementó también de manera dependiente del tiempo en los sobrenadantes de las células HaCaT transfectadas-LL-37 (Fig. 8, panel c), y la concentración intracelular de VEGF en las células transfectadas-LL-37 también fue más alta (Fig. 8, panel d). Estos resultados sugieren que el LL-37 puede regular positivamente la expresión de VEGF en el queratinocito.

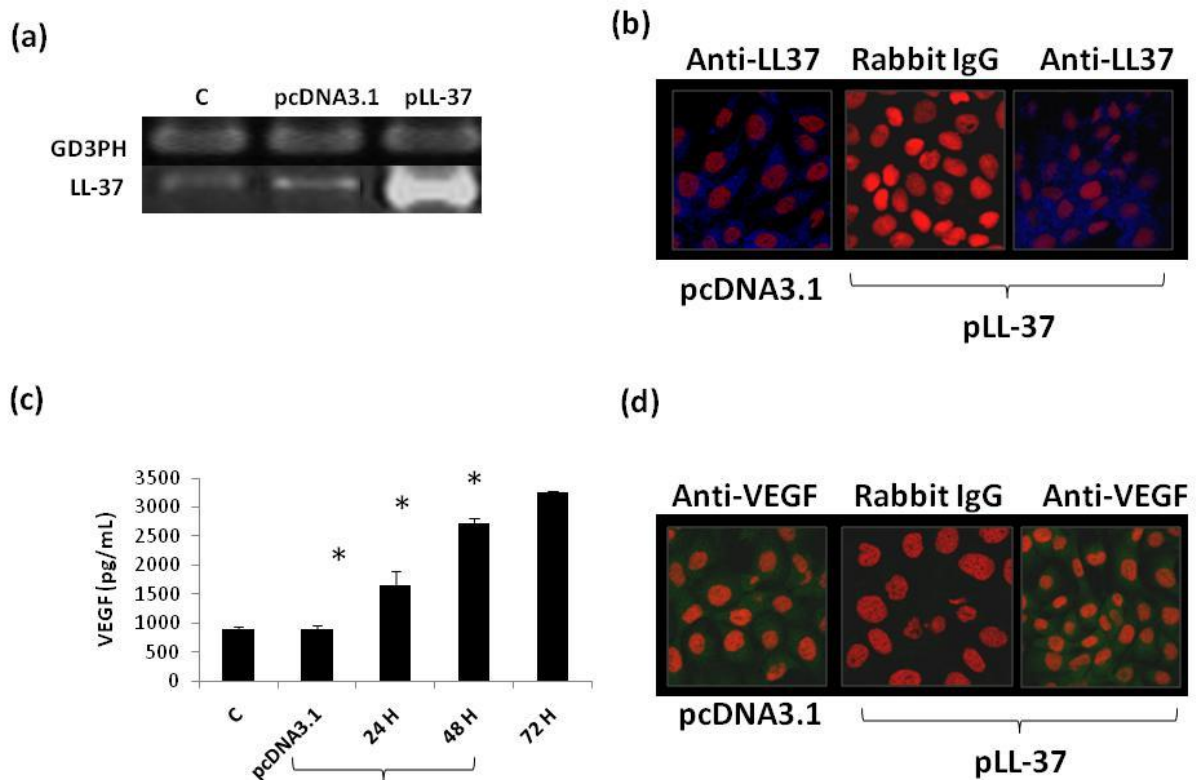


Figura 8. LL-37 aumenta la expresión de VEGF en los queratinocitos.

Panel (a): células HaCaT fueron transfectadas con 0,4 μ g de pcDNA3.1 (vector control) ó 0.4 μ g de pLL-37. La RT-PCR se llevó a cabo para analizar la expresión del ARNm-LL-37; la expresión de GD3PH se utilizó como control de carga. C= células no transfectadas. **Panel (b):** Inmunofluorescencia para LL-37 intracelular utilizando un anticuerpo anti-LL-37 en células HaCaT transfectadas con 0.4 μ g of pLL-37. **Panel (c):** ELISA para VEGF extracelular en los sobrenadantes de las células HaCaT transfectadas con 0,4 μ g de PLL-37 en diferentes tiempos de la transfección. **Panel (d):** Inmunofluorescencia para VEGF intracelular usando un anticuerpo anti-VEGF en células HaCaT transfectadas con 0.4 μ g of pLL-37. La IgG de conejo se utilizó como control en los ensayos de inmunofluorescencia. Se realizó la prueba estadística ANOVA; (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las células no transfectadas (C) y transfectadas.

Efecto de co-participación de HDAC1, LL-37 y VHL en la expresión de VEGF en las células HaCaT.

Dado que existe una relación cercana entre HDAC1 [13], LL-37 [31] y VHL [13] sobre la regulación de la expresión de VEGF en las células tumorales, los ensayos de co-transfección en células HaCaT se realizaron para analizar la co-participación de estas moléculas en la expresión de VEGF. Para estudiar el efecto del VHL sobre HDAC1, las células HaCaT fueron co-transfectadas con pHDAC1 (0,4 μ g) y con diferentes cantidades de pVHL (0,1 a 1,6 μ g). Se observó que la producción de VEGF disminuyó a medida que pVHL aumentada, sobreponiéndose a la inducción de la actividad del HDAC1 ($p < 0,05$; fig. 9, panel a). Para el análisis inverso, se utilizó una cantidad constante de pVHL y una cantidad variable de pHDAC1, se observó un aumento de la producción de VEGF a medida que se incrementaba la cantidad de HDAC1 ($p < 0,05$; fig. 9, panel b). De acuerdo con estos resultados, tanto HDAC1 y VHL tienen un efecto contrario en la producción de VEGF en los queratinocitos.

El efecto de LL-37 sobre HDAC1 en la expresión de VEGF también se estudió. La co-transfección de células HaCaT con pHDAC1 (0,4 μ g) y cantidades variables de pLL-37 mostraron un aumento de la expresión de VEGF al incrementar la concentración de pLL-37 ($p < 0,05$; fig. 9 en el panel c). Resultados similares se obtuvieron cuando las células fueron co-transfectadas con cantidades constantes de pLL-37 y diferentes de pHDAC1 ($p < 0,05$; fig. 9 en el panel d). Estos resultados sugieren que ambas moléculas tienen un efecto positivo en la regulación de la expresión de VEGF en los queratinocitos.

El mismo efecto positivo de LL-37 se observó en las células co-transfectadas con cantidades constantes de pVHL y cantidades crecientes de pLL-37 ($p < 0,05$; fig. 9, en el panel e), y efectos contrarios fueron observados en las células co-transfectadas con cantidades constantes de pLL-37 y variables de pVHL ($p < 0,05$; fig. 9 en el panel f). Estos resultados muestran que LL-37

tiene un efecto positivo sobre VEGF y que VHL tiene el efecto contrario en los queratinocitos.

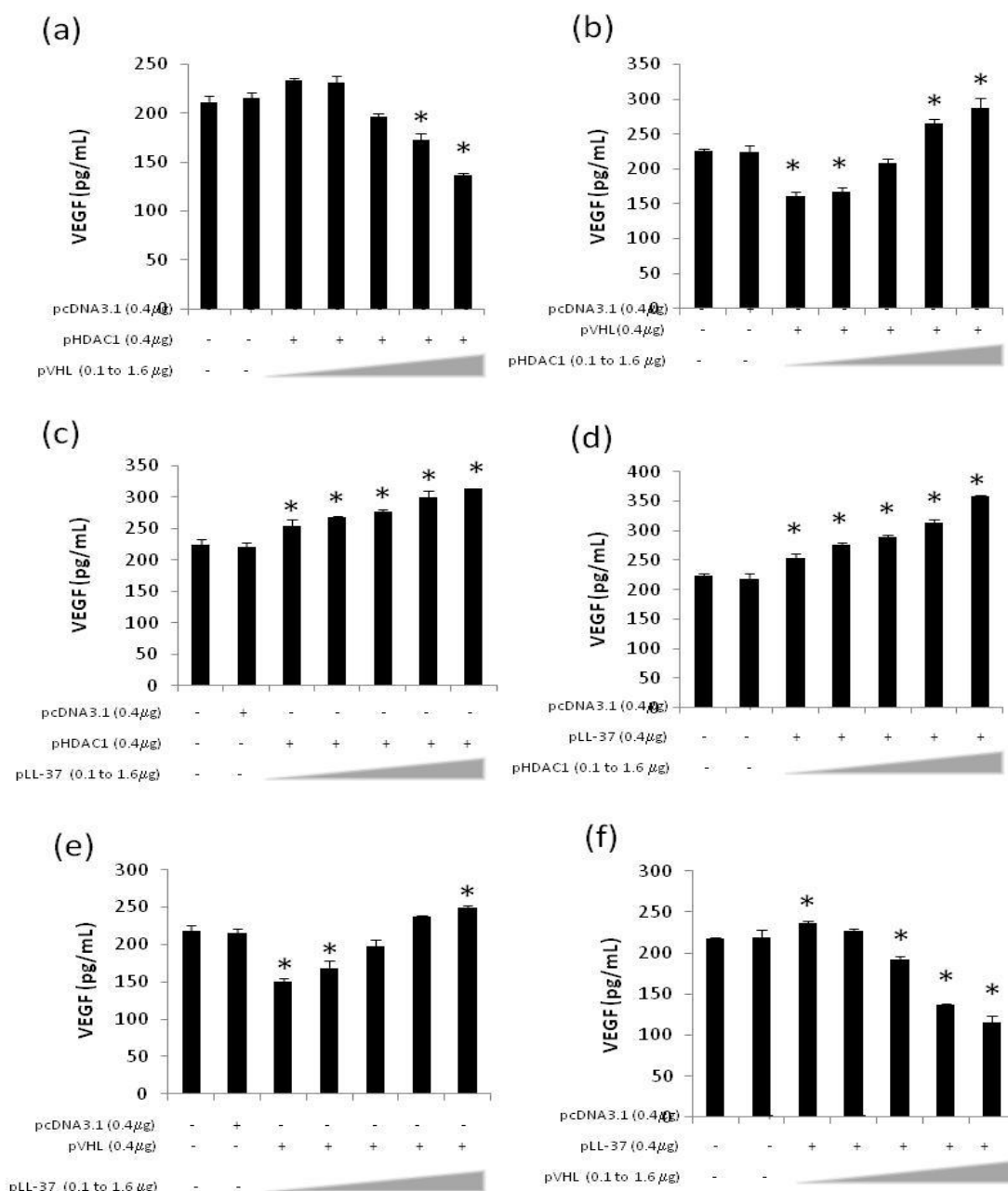


Figura 9. Efecto de la co-transfección con pHDAC1/pLL-37 pHDAC1/pVHL ó pVHL/pLL-37 sobre la expresión de VEGF en los queratinocitos.

ELISA para VEGF extracelular en los sobrenadantes de las células HaCaT co-transfectadas con pHDAC1/pLL-37, pHDAC1/pVHL ó pVHL/pLL-37. Se realizó la prueba estadística ANOVA; (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre las células no transfectadas y las células co-transfectadas.

Efecto del HDAC1, LL-37 y VHL sobre HIF-1alfa en las células HaCaT.

Se ha determinado que en las células tumorales y endoteliales HDAC1 [14], LL-37 [32] y VHL [13] juegan un papel importante en la regulación de la producción de VEGF a través de HIF-1alfa. Nosotros estudiamos la expresión y localización de HIF-1alfa por inmunofluorescencia en células HaCaT transfectadas con HDAC1, LL-37 y VHL. Observamos que las células no transfectadas y las células HaCaT transfectadas con el vector como control tienen una expresión basal de HIF-1alfa en el citoplasma (Fig. 10, panel a). En las células HaCaT transfectadas con pHDAC1 HIF-1alfa se transloca al núcleo, y en las células HaCaT transfectadas con pLL-37 HIF-1alfa se encontró aumentada sólo en el citoplasma. HIF-1alfa se detectó sólo ligeramente en el citoplasma de las células HaCaT transfectadas con pVHL (Fig. 10, panel a).

Los ensayos de co-transfección utilizando pHDAC1, pLL-37 y pVHL se realizaron en células HaCaT para analizar el efecto en la co-participación de estas moléculas sobre HIF-1alfa. Cuando las co-transfecciones se realizaron con pHDAC1 (0,4 µg) / PLL-37 (1,6 µg) ó PLL-37 (0,4 µg) / pHDAC1 (1,6 µg), que son proteínas que inhiben la degradación de HIF-1alfa, ambos ensayos de células co-transfectadas mostraron alta concentración de HIF1alpha en el citoplasma y la translocación positiva de HIF-1alfa al núcleo (Fig. 10, los paneles de bi y bii, respectivamente). Sin embargo las co-transfecciones con pHDAC1 (0,4 µg) / pVHL (1,6 µg) presentaron bajos niveles de HIF-1alfa en el citoplasma, y además HIF-1alfa no se transloca al núcleo (Fig. 10, biii panel). Por el contrario, cuando las cantidades de pHDAC1 y pVHL se invirtieron (pVHL (0,4 µg) / pHDAC1 (1,6 µg) las células co-transfectadas mostraron una mayor cantidad de HIF-1alfa en el citoplasma, pero HIF-1alfa no se observó en el núcleo (Fig. 10, panel biv). Por otro lado, cuando las células HaCaT fueron co-transfectadas con pVHL (0,4 µg) / pLL-37 (1,6 µg) las células mostraron una mayor concentración de HIF-1alfa en el citoplasma en comparación con las células co-transfectadas con pLL-37 (0,4 µg) / pVHL (1,6 µg) (Fig. 10, bv y bvi, respectivamente) y otra vez, la translocación al núcleo no se observó. Estos resultados muestran que en los queratinocitos LL-37 es capaz de evitar la degradación de HIF-1alfa, pero que no puede translocarlo al núcleo como lo

hace HDAC1 y que VHL podría promover la degradación de HIF-1alfa incluso en presencia de LL-37 y de HDAC.

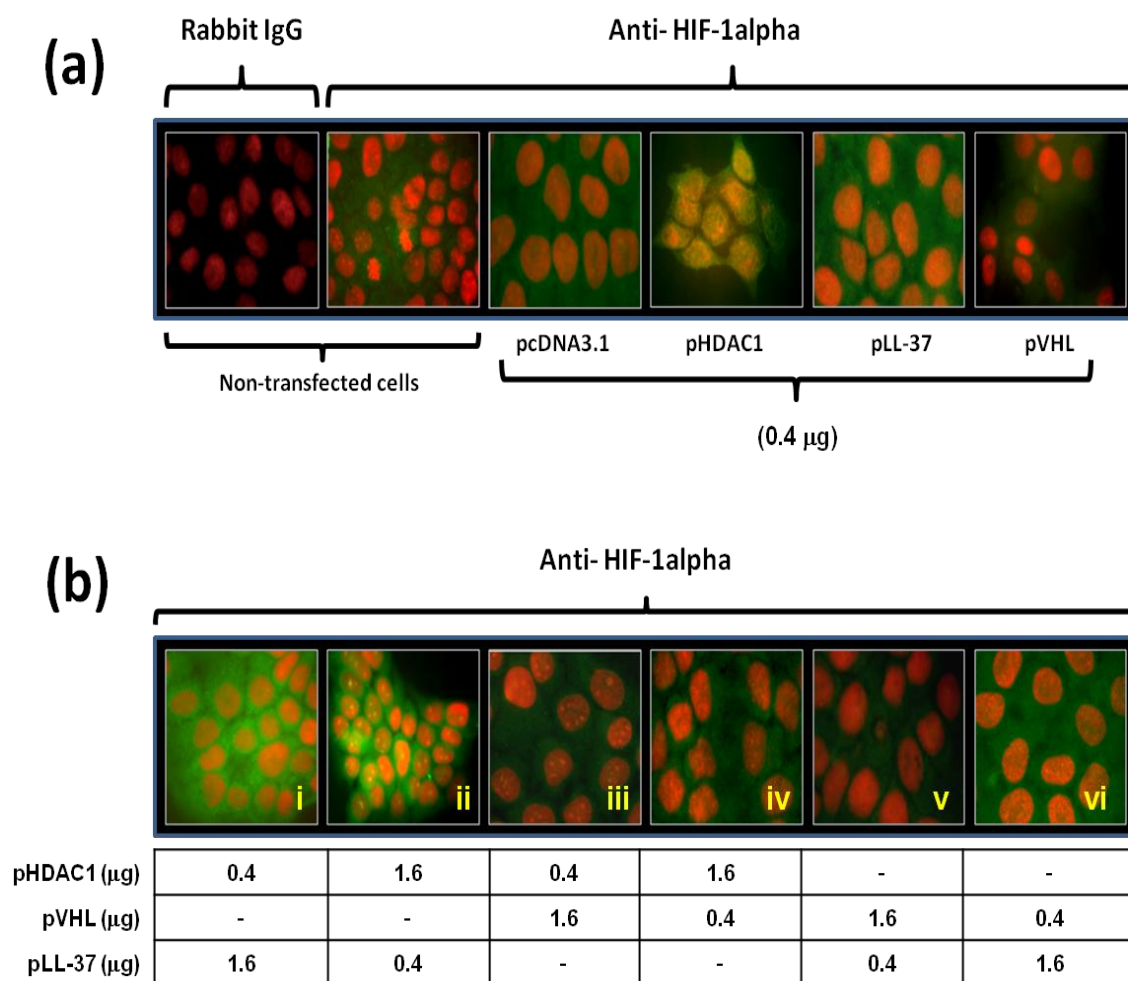


Figura 10. Expresión y localización de HIF-1 alfa en células HaCaT transfectadas con HDAC1, VHL ó LL-37.

Inmunofluorescencia de HIF-1 alfa utilizando anticuerpos anti-HIF-1 alfa en células HaCaT transfectadas con 0,4 μ g de pHDAC1, pVHL ó PLL-37 (**Panel a**), y en las células HaCaT co-transfectadas con (0,4 ó 1,6 μ g) de pHDAC1/pVHL, pHDAC1/pLL-37 ó pVHL/pLL-37 (**Panel b**).

Discusión

Las HDACs se han relacionado con procesos de angiogénesis e hiperproliferación pues en las células tumorales tratadas con los inhibidores para HDACs, tales como la TSA [47] y el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) [48], se interrumpen estos procesos. En este trabajo se encontró que en los queratinocitos tratados con TSA y con HDAC1- siRNA la producción de VEGF se redujo, lo que sugiere que HDAC1 juega un papel importante en la producción de VEGF en el queratinocito.

Se sabe que HDAC1 regula la expresión del VHL, por ejemplo, las células endoteliales humanas transfectadas con HDAC1 tienen una baja expresión del VHL [14]. Este informe está de acuerdo con nuestros resultados, porque hemos observado que en los queratinocitos transfectados con HDAC1 se mostró que HIF-1alfa se transloca hacia el núcleo, así como una alta producción de VEGF (Fig. 5, panel a), como ocurre cuando el VHL está ausente. Además, demostramos que HDAC1 puede actuar como un antagonista del efecto-VHL sobre el VEGF cuando las células HaCat fueron co-transfectadas con pHDAC1 y pVHL.

Las HDACs actúan sobre diferentes sustratos, además de las histonas, uno de ellos es el HIF-1alfa acetilado [49]. En líneas celulares de cáncer de mama la desacetilación de HIF-1alfa está mediada por el complejo deacetilasa remodelador del nucleosoma (NuRD) [45]. Este complejo consta de HDAC1 ó HDAC2 y la proteína asociada a metástasis 1 (MTA1). La MTA1 [50], la HDAC1 y la HDAC2 [51,52], se han visto expresadas en epidermis humana y en los queratinocitos HaCaT. Por esta razón, con nuestros resultados, sugerimos que en las células transfectadas con el pHDAC1, el complejo NuRD podría estar desacetilando el HIF-1alfa para evitar su degradación vía VHL, lo que lleva a la acumulación de VEGF.

En las células tumorales ha sido bien determinado que, en condiciones de normoxia la proteína VHL es parte del complejo ubiquitina ligasa E3 que ubiquitina el HIF-1alfa hidroxilado, y que el HIF-1alfa ubiquitinado es susceptible a la degradación proteasomal, y que como consecuencia de los

bajos niveles de HIF-1alfa la producción de VEGF disminuye [53]. En este trabajo se observó que en los queratinocitos la producción de VEGF es también controlada de manera negativa por la actividad del VHL (que a su vez está regulada por el HDAC1, fig. 2). Estos datos apoyan la observación en las biopsias de piel psoriásica (tejidos muy vascularizados) debido a la ausencia del gene VHL y la presencia de HDAC1 en estas biopsias [28], lo que puede explicar la elevada producción de VEGF. Otras evidencias que apoyan esta propuesta son los ratones que mantienen una selección epidérmica *vhl*^{-/-} que muestran un aumento en la vascularización cutánea [54], además de los queratinocitos *vhl*^{-/-} sobre-expresan HIF-1alfa y HIF-2alfa [55] produciendo el aumento de los genes blancos de HIFs como el VEGF-, PGK-, GLUT1-, Inos-mRNAs y eritropoyetina [56]. En el estudio de este fenómeno biológico en los queratinocitos observamos que la sobre-expresión del VHL disminuye la translocación de HIF-1alfa al núcleo (Fig. 5, panel a). Estos resultados sugieren que, como ocurre en los tejidos tumorales, el VHL regula negativamente la expresión de VEGF a través de HIF-1alfa en los queratinocitos.

En las células endoteliales, la catelicidina humana LL-37 [57], así como el PR39 porcino [32], se han reportado que desarrollan actividad angiogénica. Recientemente se informó que en los queratinocitos transfectados con LL-37 producen grandes cantidades de VEGF [58], y que peptidoglicano de *Staphylococcus aureus* induce la producción de LL-37 y VEGF en este tipo de células [59]. Analizando en el queratinocito la actividad reguladora de LL-37 sobre el VEGF, observamos que LL-37, junto con el HDAC1, aumentan la expresión del HIF-1alfa y de VEGF en las células co-transfectadas. Estos resultados sugieren que el LL-37 tiene un papel importante en la angiogénesis de la psoriasis, ya que este péptido está altamente expresado en las lesiones psoriásicas, junto con otras moléculas asociadas con la actividad pro-angiogénica como el HIF-1alfa y HDAC1 [28]. Además de la sugerencia de su actividad pro-angiogénica, recientemente LL-37 se ha asociado fuertemente como posible factor desencadenante en la etiopatogenia de la psoriasis. El reporte de Lande, y colaboradores subrayó que los queratinocitos liberan su propio ADN que forma complejos con el LL-37, que a su vez activa células dendríticas plasmacitoides (pDCs) para producir interferón-alfa (IFN alfa) [60].

Las células dendríticas dérmicas activadas por el IFN-alfa (producido por pDCs) conducen a la producción de citocinas Th1 y Th17, que a su vez, inducen la proliferación de los queratinocitos [61].

Resumiendo todos estos resultados, y su traslape a lo que ocurre en la lesión psoriásica, sugerimos que la hiperproliferación de queratinocitos conlleva a condiciones de hipoxia (según lo sugerido por otros autores) [56, 62,63] y, en este entorno los queratinocitos producen grandes cantidades de VEGF a través de HIF-1alfa que no es ubiquitinado por el VHL, debido a la intervención de HDAC1 y LL-37, como se ve en los tejidos tumorigénicos [3, 13, 14,32].

Con estos datos, los nuevos compuestos que inhiben la actividad de HDAC1 y LL-37, o que activan el VHL, podrían ser utilizados como nuevos blancos para el control de la angiogénesis en la psoriasis.

Conclusiones

El HDAC1 tiene actividad proangiogénica al regular de manera positiva la expresión de VEGF y de HIF-1alfa en el queratinocito, así también al disminuir la expresión de VHL en este tipo celular.

El VHL es capaz de regular negativamente la expresión de VEGF, LL-37, y HDAC1 en el queratinocito, proponiendo a este gen supresor del tumor como un agente antiangiogénico.

Los inhibidores de HDAC1 (TSA y el si-RNA-HDAC1) disminuyen la expresión del HDAC y su unión al HIF-1 alfa evitando la degradación de HIF-1alfa, lo que deriva en la disminución en la producción de VEGF.

Bibliografía.

1. Dvorak,H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol* 2002. **20**:4368-4380
2. Kwon YW, Kwon KS, Moon HE, Park JA, Choi KS, Kim YS, et al. Insulin-like growth factor-II regulates the expression of vascular endothelial growth factor by the human keratinocyte cell line HaCaT. *J Invest Dermatol* 2004; **123**:152–8.
3. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; **394**:485-90.
4. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:5510-4.
5. Lee JL, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.* 2004. **36**(1), 1-12.
6. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006. **70**:1469–1480.
7. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF-alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001; **292**:464-8.
8. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; **292**:468-72.
9. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, and Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002a; **16**:1466-1471.
10. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002; **111**:709-20.

11. Hur E, Chang KY, Lee E, Lee SK, and Park H Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Pharmacol* 2001: **59**:1216-1224.
12. Latif F, Tory K, Yao M, Duh FM, Orcutt M., Stackhouse T, Zhou F, Li H, Wei MH, Chen F, Glenn ., Choyke P. Weng Y, Duan DS R, Dean M, Glavac D, Richards FM, Ferguson- Smith MA, Le Paslier D, Chumakov I, Cohen D, Chinault AC, Maher ER, Linehan WM, Zbar B, Lerman MI. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993. **260**:1317-1320.
13. Kaelin W G Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008: **8**:865-73.
14. Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* 2001: **7**:437-43.
15. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997: **389**:349-52.
16. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 2009: **10**:32-42.
17. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 1999. **401**:188-93.
18. Vannini A, Volpari C, Filocamo G, Casavola EC, Brunetti M, Renzoni D, Chakravarty P, Paolini C, De Francesco R, Gallinari P, Steinkuhler C, Di Marco S. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. **101** (42):15064-9. Epub 2004 Oct 11.
19. Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 2003. **19**(5):286-93
20. Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 2004. **73**:417-35.

21. Jackson MD, Denu JM. Structural identification of 2'- and 3'-O-acetyl-ADPribose as novel metabolites derived from the Sir2 family of beta - NAD⁺- dependent histone/protein deacetylases. *J Biol Chem* 2002. **277**(21):18535-44
22. Tanner KG, Landry J, Sternglanz R, Denu JM. Silent information regulator 2 family of NAD⁻ dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000. **97**(26):14178-82.
23. Taunton J., Hassig C. A. and Schreiber S.L. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 1996. **272**(5260): 408.
24. Kim SH, Ahn S, Han JW, , Lee HW, Lee HY, Lee YW, et al. Apicidin is a histone deacetylase inhibitor with anti-invasive and anti-angiogenic potentials. *Biochem Biophys Res Commun* 2004: **315**:964-70.
25. Sasakawa Y, Naoe Y, Noto T, Inoue T, Sasakawa T, Matsuo M, et al. Antitumor efficacy of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, depends on the effect on expression of angiogenesis factors. *Biochem Pharmacol* 2003: **66**:897-906.
26. Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, Devy L, Colige A, Clausse N, et al. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* 2002: **21**:427-36.
27. Xia YP, Li B, Hylton D, Detmar M, Yancopoulos GD, Rudge JS. Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood* 2003: **102**:161-8.
28. Tovar-Castillo LE, Cancino-Díaz JC, García-Vázquez F, Cancino-Gómez FG, León-Dorantes G, Blancas-González F, et al. Under-expression of VHL and over-expression of HDAC-1, HIF-1alpha, LL-37, and IAP-2 in affected skin biopsies of patients with psoriasis. *Int J Dermatol* 2007: **46**:239-46.
29. International Symposium: Angiogenesis and cancer: from basic mechanisms to therapeutic applications. Spain Malaga, November 13-13, 2008.
30. Isner J. Vascular endothelial growth factor-induction of angiogenesis. *J Vasc Surg* 2000: **31**: 1252-5.

31. Simons M. Inflammation and angiogenesis. *J Vasc Surg* 2000; **31**: 1257-8.
32. Li J, Post M, Volk R, Gao Y, Li M, Metais C, Sayo K, Tsai J, Aird W, Rosenberg DR, Hampton GT, Li J, Sellke F, Carmeliet P, Simons M. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 2000; **6**: 49-55.
33. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; **237**:1-30.
34. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD and Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; **16**, 4604–4613.
35. Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. Hypoxic Stabilization of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA by the RNA-binding Protein Hur. *J Biol Chem* 1998; **273**: 6417-6423.
36. Ozawa, K., et al. Expression of the oxygen regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J. Clin. Invest.* 2001;**108**:41–50
37. Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998; **95**: 7987-7992
38. Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y. and Poellinger, L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**, 6519–6525
39. Salceda, S. and Caro, J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**, 22642–22647.
40. Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. HIF-1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;**97**:4748–4753
41. Iliopoulos O., Kibel A., Gray S., Kaelin W.G. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat. Med.* 1995: 1:822-826.

42. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*. 2002;**277**:38205-38211
43. Thornton, R. D., P. Lane, R. C. Borghaei, E. A. Pease, J. Caro, and E. Mochan. Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem J*. 2000: **350**:307–312.
44. Zhong, H., G. L. Semenza, J. W. Simons, and A. M. De Marzo. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is an early event in prostate carcinogenesis. *Cancer Detect. Prev*. 2004: **28**:88–93
45. Bramihi-Horn, C., N. Mazure, and J. Pouyssegur. Signaling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple posttranslational modifications. *Cell. Signal*. 2005: **17**:1–9.
46. Yoo Y G, Kong G, Lee M O. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1 α protein by recruiting histone deacetylase 1. *EMBO J* 2006: **25**:1231-41.
47. Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M, Horinouchi S. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001: **98**:87-92.
48. Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 2007: **109**:31-9.
49. Kouzarides T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* 2000: **19**:1176-9.
50. Mahoney M G, Simpson A, Jost M, Noé M, Kari C, Pepe D, et al. Metastasis-associated protein (MTA)1 enhances migration, invasion, and anchorage-independent survival of immortalized human keratinocytes. *Oncogene* 2002: **21**:2161-70.
51. Lin Z, Bazzaro M, Wang MC, Chan KC, Peng S, Roden RB. Combination of proteasome and HDAC inhibitors for uterine cervical cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2009: **15**:570-7.

52. Aarenstrup L, Flindt EN, Otkjaer K, Kirkegaard M, Andersen JS, Kristiansen K. HDAC activity is required for p65/RelA-dependent repression of PPARdelta-mediated transactivation in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2008; **128**:1095-106.
53. Kaelin WG Jr. The von hippel-lindau tumor suppressor protein: an update. *Methods Enzymol* 2007; **435**:371-83.
54. Kim WY, Safran M, Buckley MR, Ebert BL, Glickman J, Bosenberg M, et al. Failure to prolyl hydroxylate hypoxia-inducible factor alpha phenocopies VHL inactivation in vivo. *EMBO J* 2006; **25**:4650-62.
55. Haase VH. The VHL tumor suppressor in development and disease: functional studies in mice by conditional gene targeting. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16**:564-74.
56. Boutin AT, Weidemann A, Fu Z, Mesropian L, Gradin K, Jamora C, et al. Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell* 2008; **133**:223-34.
57. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 2003; **111**:1665-72.
58. Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz JC, Vargas-Zuñiga LM, Cancino-Díaz ME. LL-37 regulates the overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and c-IAP-2 in human keratinocytes. *Int J Dermatol* 2008; **47**:457-62.
59. Ruíz-González V, Cancino-Díaz JC, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz ME. Keratinocytes treated with peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* produce vascular endothelial growth factor, and its expression is amplified by the subsequent production of interleukin-13. *Int J Dermatol* 2009; **48**:846-54.
60. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007; **449**:564-9.
61. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff B J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**:679-91.

62. Evans SM, Schrlau AE, Chalian AA, Zhang P, Koch CJ. Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by EF5 binding. *J Invest Dermatol* 2006; **126**:2596-606.
63. Rosenberger C, Solovan C, Rosenberger AD, Jinping L, Treudler R, Frei U, et al. Upregulation of hypoxia-inducible factors in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 2007; **127**:2445-52.