



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL FACTOR  
HIF-1 $\alpha$  POR *N*-ACIL DOPAMINAS. IMPLICACIONES EN  
NEUROPROTECCIÓN**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología por**

**Rafael Soler Torronteras**

**Directores**

**Eduardo Muñoz Blanco**

**Marco Antonio Calzado Canale**

**Córdoba, Enero de 2015**

TITULO: *Estudio de los mecanismos de regulación del factor HIF-1 a por N-acil dopaminas. Implicaciones en neuroprotección.*

AUTOR: *Rafael Soler Torronteras*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





### **TÍTULO DE LA TESIS:**

Estudio de los mecanismos de regulación del factor HIF-1 $\alpha$  por *N*-acil dopaminas. Implicaciones en neuroprotección.

### **DOCTORANDO/A:**

Rafael Soler Torronteras

### **INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

El documento presentado por el doctorando Rafael Soler Torronteras, con título “Estudio de los mecanismos de regulación del factor HIF-1 $\alpha$  por *N*-acil dopaminas. Implicaciones en neuroprotección.” corresponde a su trabajo de tesis doctoral realizado en el periodo comprendido entre Marzo de 2011 y Enero de 2015. En este trabajo se han cumplido los objetivos establecidos al comienzo del proyecto haciendo posible el aprendizaje de técnicas experimentales de gran relevancia y utilidad en el campo de la investigación. Esto ha permitido la obtención de resultados acerca del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  en el ámbito de la neuroprotección contribuyendo al avance de este área algo menos estudiada. La finalidad del estudio ha sido compensada con la publicación de un artículo científico en una revista indexada dentro del primer cuartil de su área. De manera conjunta a la elaboración de este proyecto, se han realizado trabajos en apoyo a otros miembros del grupo los cuales también han contribuido al avance y finalización de este trabajo dando lugar a otras publicaciones. Además, se ha dado difusión a los resultados obtenidos de todos los trabajos mediante la presentación de los mismos a jornadas y congresos siendo expuestos tanto mediante comunicaciones orales como comunicaciones tipo póster.

### **PUBLICACIONES Y TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL**

#### **\_ Publicaciones derivadas de la tesis doctoral.**

- **Rafael Soler-Torronteras**, Maribel Lara-Chica, Víctor García, Marco A. Calzado, Eduardo Muñoz. Hypoximimetic activity of *N*-acyl-dopamines. *N*-arachidonoyl-dopamine stabilizes HIF-1 $\alpha$  protein through a SIAH2-dependent pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014, 1843(11):2730-2743.

Factor de impacto: 5,297. Área temática: Bioquímica y biología molecular. Posición de la revista: 52/291. Primer cuartil (Q1).

#### **\_ Publicaciones en colaboración durante el desarrollo de la tesis doctoral.**

- Moisés Pérez, **Rafael Soler-Torronteras**, Juan A. Collado, Carmen G. Limones, Rebecka Hellsten, Martin Johansson, Olov Sterner, Anders Bjartell, Marco A. Calzado, Eduardo Muñoz. The fungal metabolite galiellalactone interferes with the nuclear import of NF- $\kappa$ B and inhibits HIV-1 replication. *Chemico-Biological Interactions*. 2014, 214:69-76.

Factor de impacto: 2,982. Área temática: Bioquímica y biología molecular. Posición de la revista: 133/291. Segundo cuartil (Q2).

- Francisco J. Caballero, **Rafael Soler-Torronteras**, Maribel Lara-Chica, Víctor García, Bernd L. Fiebich, Eduardo Muñoz, Marco A. Calzado. AM404 inhibits NFAT and NF- $\kappa$ B signaling pathways and impairs migration and invasiveness of neuroblastoma cells. *European Journal of Pharmacology*. 2015, 746: 221-232.

Factor de impacto: 2,684. Área temática: Farmacología y farmacia. Posición de la revista: 98/256. Segundo cuartil (Q2).

#### **\_ Comunicaciones presentadas a congresos internacionales.**

- **Rafael Soler-Torronteras**, Moisés Pérez, Carmen García Limones, Marco A, Calzado, Eduardo Muñoz. Effect of the endocannabinoid *N*-arachidonoyl dopamine (NADA) in the hypoxia response pathway. 1<sup>st</sup> Spanish-Italian joint meeting on Cannabinoid Research 2012, Madrid (Spain). Comunicación oral.

#### **\_ Comunicaciones presentadas a jornadas.**

- **Rafael Soler Torronteras**, Amaranta Armesto, Maribel Lara, Eduardo Muñoz and Marco A. Calzado. The ubiquitin ligase SIAH2 is a central regulator of DYRK-family kinases class II. V Jornada de Jóvenes Investigadores del IMIBIC, 2014. Córdoba. Póster.
- **Rafael Soler Torronteras**, Moisés Pérez Aguilera, Carmen García Limones, Marco A. Calzado y Eduardo Muñoz. Efecto hipóxico mimético y neuroprotector de las *N*-acil-dopaminas endógenas. III Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba, 2013. Córdoba. Comunicación oral.
- **Rafael Soler Torronteras**, Moisés Pérez, Carmen García Limones, Marco A, Calzado, Eduardo Muñoz. Effect of the endocannabinoid *N*-arachidonoyl dopamine (NADA) in

the hypoxia response pathway. III Jornada de Jóvenes Investigadores del IMIBIC, 2012. Córdoba. Comunicación oral.

**\_ Premios obtenidos.**

- Premio a la mejor comunicación en la rama de Ciencias de la Salud.

- **Rafael Soler Torronteras**, Moisés Pérez Aguilera, Carmen García Limones, Marco A. Calzado y Eduardo Muñoz. Efecto hipóxico mimético y neuroprotector de las *N*-acil-dopaminas endógenas. III Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba, 2013. Córdoba.

- Premio a la mejor presentación oral en la sesión de enfermedades inflamatorias crónicas y enfermedades infecciosas. Senescencia.

- **Rafael Soler Torronteras**, Moisés Pérez, Carmen García Limones, Marco A, Calzado, Eduardo Muñoz. Effect or the endocannabinoid *N*-arachidonoyl dopamine (NADA) in the hypoxia response pathway. III Jornada de Jóvenes Investigadores del IMIBIC, 2012. Córdoba.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 21 de Enero de 2015

Firma del/de los director/es

Fdo.: Eduardo Muñoz Blanco

Fdo.: Marco A. Calzado Canale



## *AGRADECIMIENTOS*

---





## **AGRADECIMIENTOS**

Tras el gran esfuerzo que ha supuesto realizar este trabajo, ahora con la mente despejada toca acordarse de todas aquellas personas que de una manera u otra han hecho posible que este trabajo haya salido adelante.

La primera mención, por supuesto, es para los directores de dicho trabajo, Marco y Eduardo que gracias a la confianza que han depositado en mi he podido cumplir el sueño de realizar una tesis doctoral y haber contribuido con un pequeño aporte al avance científico. No tengo manera de agradecerles todos los momentos que tras 4 años han ocurrido, en especial a Marco, por haber actuado en algunas ocasiones incluso como algo más que un jefe. Del mismo modo no puedo olvidar a José Luis y Juan, mis primeros "jefes" que consiguieron despertarme el interés por el conocimiento. Y por extensión, a Fran, quien supo enseñar de la mejor manera posible a un recién licenciado.

También es imposible no acordarse de todos los compañeros que durante este tiempo me han acompañado y que con mejor o peor entendimiento hemos pasado siempre buenas experiencias.

Agradecer parte de este trabajo a mis amigos, a los compañeros de clase que gracias a sus valoraciones, comentarios e interés hacia mi trabajo han permitido ver cosas las cuales el estrés ya no permitía ver y a mis amigos del barrio, los de toda la vida, que aunque de manera menos "científica" gracias a sus preguntas (en ocasiones disparatadas) han conseguido igualmente ver esas cosas que en parte bloqueaban el avance.

Finalizando, toca el turno a la familia. Mamá, papá y hermana, gracias. Habéis conseguido que la parte no científica y no laboral de esta tesis haya sido posible. Y la última mención por supuesto va para Transi. Merecedora de la mitad o más de este trabajo por ser la encargada de aguantarme en los momentos buenos (sí, aquí también hay que saber aguantarme) y en los menos buenos, tanto laborales como los ajenos, por sufrir mis enfados y agobios derivados del trabajo y saber derivarlos hacia algo mejor, por saber esperar largas tardes hasta mi fin de jornada (que en ciencia ya se sabe que pueden ser eternas), y en definitiva por TODO. Gracias y continuamos en París...

*Dedicado a todos aquellos que creyeron en esta posibilidad.*



La verdad no demanda creencias. Los científicos no unen sus manos cada domingo, cantando ¡Sí, la gravedad es real! ¡Tendré fe! ¡Seré fuerte! Creo en mi corazón que lo que sube tiene que bajar. ¡Amén!'. Si lo hicieran, pensaríamos que están bastante inseguros de ello.

*Dan Barker.*



## *ÍNDICE*

---



## ÍNDICE

I.- ABREVIATURAS. ....	3
II.- RESUMEN Y ABSTRACT.....	9
1.- Resumen. ....	9
2.- Abstract. ....	11
III.- INTRODUCCIÓN. ....	15
1.- El sistema endocannabinoide. ....	15
1.1.- Endocannabinoides.....	15
1.2.- Receptores cannabinoides.....	17
1.3.- Síntesis y degradación de los endocannabinoides.....	18
2.- <i>N</i> -acil dopaminas y <i>N</i> -araquidonoil dopamina. ....	19
2.1.- <i>N</i> -acil dopaminas. ....	19
2.2.- <i>N</i> -araquidonoil dopamina. ....	19
3.- Homeostasis del oxígeno.....	21
3.1.- Ruta de respuesta a hipoxia. ....	22
3.2.- Factor inducible por hipoxia. ....	23
3.3.- Regulación del factor inducible por hipoxia. ....	24
4.- SIAH (Seven In Absentia Homolog).....	27
4.1.- SIAH2. ....	27
5.- Implicaciones biológicas y fisiopatológicas de la modulación de HIF-1 $\alpha$ . ....	29
5.1.- Implicaciones biológicas de la modulación de HIF-1 $\alpha$ .....	29
- Eritropoyesis y metabolismo del hierro ..... 29	
- Angiogénesis..... 30	
- Tono vascular y metabolismo de la matriz..... 30	
- Metabolismo de la glucosa..... 30	
- Proliferación celular y supervivencia..... 31	
- Apoptosis..... 31	
5.2.- Implicaciones fisiopatológicas de la modulación de HIF-1 $\alpha$ . ....	32
- Desarrollo embrionario ..... 32	
- Cáncer..... 33	
- Enfermedad isquémica ..... 33	



5.3.- Manipulación farmacológica de la ruta de HIF-1 $\alpha$ .	34
IV.- OBJETIVOS.	37
V.- MATERIALES Y MÉTODOS.	41
1.- Líneas celulares.	41
2.- Transfección y plásmidos.	41
3.- Reactivos.	41
4.- Western blot y anticuerpos.	42
5.- Ensayo de inmunoprecipitación.	43
6.- Ensayo de luciferasa.	43
7.- Tratamiento con Tolcapona y 2,6-dichloro-4-nitrophenol (DCNP).	43
8.- Extracción de ARN y qRT-PCR.	43
9.- PCR Array.	45
10.- Ensayo de angiogénesis.	45
11.- Ensayo de viabilidad celular.	45
12. Péptido-quinasa-array.	46
13.- Análisis estadístico.	46
VI.- RESULTADOS.	49
1.- Las <i>N</i> -acil dopaminas median la estabilización de HIF-1 $\alpha$ a través de mecanismos independientes de CB <sub>1</sub> y TRPV1.	49
2.- Análisis estructura-actividad de las <i>N</i> -acil dopaminas sobre la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .	50
3.- NADA estabiliza HIF-1 $\alpha$ en diferentes tipos celulares de origen neuronal.	51
4.- NADA afecta a la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .	52
5.- NADA induce la degradación de PHD3 sin afectar a la expresión de PHD2.	53
6.- NADA no sinergiza con la hipoxia en la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .	54
7.- NADA afecta la expresión de SIAH2.	56
8.- SIAH2 participa en la estabilización de HIF-1 $\alpha$ mediada por NADA a través de PHD3.	57
9.- NADA incrementa la actividad de SIAH2.	58
10.- NADA no afecta ni a la dimerización de SIAH2 ni a su regulación a través de la ruta AKT.	60
11.- NADA no afecta a la fosforilación de SIAH2.	63
12.- NADA incrementa la expresión de genes neuroprotectores y la supervivencia celular en respuesta a hipoxia.	64

13.- Actividad angiogénica de NADA. ....	66
14.- El tratamiento con Tolcapona y DCNP no aumenta la expresión de genes relacionados con la ruta de respuesta a hipoxia. ....	67
VII.- DISCUSIÓN. ....	71
VIII.- CONCLUSIONES. ....	79
IX.- BIBLIOGRAFÍA. ....	83
X.- ANEXOS. ....	105
1.- Publicación derivada de la tesis doctoral. ....	105



## *ABREVIATURAS*

---



## I.- ABREVIATURAS.

<b>2-AG</b>	2-araquidonoil glicerol
<b>2-AGE</b>	Noladín éter
<b>2-OG</b>	2-oxoglutarato
<b>AA</b>	Acido araquidónico
<b>AADC</b>	L-aminoácido descarboxilasa
<b>ADM</b>	Adrenomodulina
<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>AEA</b>	Anandamida
<b>AGS</b>	Suplemento de crecimiento de astrocitos
<b>AKT</b>	Proteína quinasa B
<b>AMT</b>	Transportador de anandamida
<b>Angptl4</b>	Angiopietin-like 4
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AST</b>	Aril sulfotransferasa
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>bHLH</b>	Dominio básico helix-loop-helix
<b>BNIP3</b>	Proteína de interacción con BCL2/adenovirus E1B 19 Kd
<b>CA-9</b>	Anhidrasa carbónica 9
<b>CB</b>	Receptor cannabinoide
<b>CHX</b>	Cicloheximida
<b>COMT</b>	Catecol-O-metil transferasa
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>C-TAD</b>	Dominio de transactivación C-terminal
<b>DCNP</b>	2,6-Dicloro-4-nitrofenol
<b>DYRK2</b>	Quinasa regulada por tirosina de especificidad dual tipo 2
<b>ECGS</b>	Suplemento de crecimiento celular endotelial
<b>EGLN</b>	Egg-laying nine
<b>EPO</b>	Eritropoyetina
<b>ET1</b>	Endotelina 1
<b>FAAH</b>	Amida hidrolasa de ácidos grasos

<b>FIH-1</b>	Factor de inhibición de HIF-1
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa
<b>GPR</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HBMEC</b>	Células microvasculares endoteliales cerebrales humanas
<b>HIF</b>	Factor inducible por hipoxia
<b>HIPK2</b>	Quinasa de interacción de homeodominio tipo 2
<b>HK2</b>	Hexoquinasa 2
<b>HMOX</b>	Hemo oxigenasa
<b>HPH</b>	Proil hidroxilasa de HIF
<b>HRE</b>	Elementos de respuesta a hipoxia
<b>HUVEC</b>	Células endoteliales de vena umbilical humana
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento insulínico
<b>IPAS</b>	PAS inhibitoria
<b>LOX</b>	Lipooxigenasas
<b>MAGL</b>	Monoacil glicerol lipasa
<b>MAPK</b>	Quinasa activada por mitógeno
<b>MDM2</b>	E3 ubiquitina ligasa oncogénica doble minuto murina
<b>MEF</b>	Fibroblasto de embrión de ratón
<b>MMPs</b>	Metaloproteinasas de la matriz
<b>NADA</b>	<i>N</i> -araquidonoil dopamina
<b>NGS</b>	Suplemento de crecimiento neuronal
<b>NOS2</b>	Sintasa de oxido nítrico
<b>N-TAD</b>	Dominio de transactivación N-terminal
<b>ODDD</b>	Dominio de degradación dependiente de oxígeno
<b>OEA</b>	<i>N</i> -oleil etanolamina
<b>OLDA</b>	<i>N</i> -oleil dopamina
<b>PAI</b>	Plasminógeno activador inhibitorio
<b>PALDA</b>	<i>N</i> -palmitoil dopamina
<b>PAS</b>	Dominio Per-ARNT-Sim

---

<b>PEA</b>	<i>N</i> -palmitoil etanolamina
<b>PH</b>	Precondicionamiento hipóxico
<b>PHD</b>	Dioxigenasa de dominio prolil hidroxilasa
<b>PHYL</b>	Proteína de interacción tipo phyllopod
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa
<b>PPARs</b>	Receptores activados pre proliferadores de peroxisomas
<b>pVHL</b>	Proteína Von Hippel-Lindau
<b>RING</b>	Real interesting new gene
<b>SBD</b>	Dominio de unión a sustrato
<b>SE</b>	Sistema endocannabinoide
<b>SIAH</b>	Seven in absentia homolog
<b>SIP</b>	Proteína de interacción con SIAH
<b>SLC2A1</b>	Solute carrier family 2
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>STEARDA</b>	<i>N</i> -estearoil dopamina
<b>TCA</b>	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
<b>Tf</b>	Transferrina
<b>Tfr</b>	Receptor de transferrina
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa
<b>THC</b>	Tetrahidrocannabinol
<b>TRPV1</b>	Receptor de vanilloides tipo 1
<b>USP13</b>	Proteasa específica de ubiquitina tipo 13
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular





*RESUMEN Y ABSTRACT*

---



## II.- RESUMEN Y ABSTRACT.

### 1.- Resumen.

La hipoxia es el estado por el cual se priva al organismo del suministro de oxígeno adecuado. Esta privación en algunos casos provoca daños en los tejidos y órganos y está relacionada con trastornos cardiorrespiratorios, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. En la literatura, se han descrito multitud de evidencias de que ciertos neurolípidos como los endocannabinoides puede ejercer efectos neuroprotectores y anti-inflamatorios, debido a su participación en procesos de comunicación celular y molecular entre los diferentes tipos celulares del cerebro (especialmente entre neuronas, astrocitos y células de la microglía).

El Sistema Endocannabinoide incluye receptores celulares, ligandos endógenos y enzimas que regulan la biosíntesis y degradación de los ligandos. Uno de sus ligandos es la *N*-araquidonoil dopamina (NADA), la cual parece jugar un papel relevante en los procesos de neuroprotección, ya que media importantes efectos biológicos a través de mecanismos dependientes e independientes de receptor (CB<sub>1</sub> y TRPV1). Del mismo modo, de manera general las *N*-acil dopaminas también regulan el metabolismo del ácido araquidónico al actuar como sustratos o inhibidores de las lipooxigenasas.

También se ha descrito que la inhibición farmacológica de la proteína PHD (prolil-hidroxilasa) induce la activación del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , el cual es el eje central del mecanismo neuroprotector de estos inhibidores (también llamados agentes hipoximiméticos). HIF-1 $\alpha$  modula la transcripción de genes implicados en protección neuronal, además de provocar respuestas adaptativas tanto en células neuronales como no neuronales y en situaciones muy diversas como accidentes cerebrovasculares y enfermedades de Parkinson, Huntington y Alzheimer. Nuestros resultados demuestran como NADA y otras *N*-acil dopaminas son capaces de inducir la estabilización y activación de HIF-1 $\alpha$  en líneas neuronales y no neuronales y que lo hace a través de la sobre activación de la proteína E3 ubiquitina ligasa SIAH2, la cual es responsable de la inhibición de la proteína PHD. Con este estudio se explica al menos un mecanismo de acción por el cual ciertos endocannabinoides presentan efectos anti-inflamatorios y neuroprotectores. Además, y lo más importante, abre las puertas a nuevas vías de investigación para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias.

Finalmente, los resultados obtenidos en la presente tesis han contribuido a estudiar el efecto de NADA y otras *N*-acil dopaminas sobre los niveles de HIF-1 $\alpha$  en diferentes líneas celulares, caracterizando los posibles mecanismos bioquímicos y moleculares por los que es posible esta estabilización, poniendo de manifiesto el papel de la ubiquitina ligasa SIAH2 en la acción hipoximimética de NADA.



## 2.- Abstract.

Hypoxia is the condition whereby the organism is deprived of adequate oxygen supply. This deprivation in some cases causes damage to tissues and organs and is associated with cardiorespiratory disorders, cancer and neurodegenerative diseases. In the literature, have been described many evidence that certain neurolipids as endocannabinoids may exert neuroprotective and anti-inflammatory effects due to their participation in processes of cell and molecular communication between the different cell types of the brain (especially among neurons, astrocytes and microglial cells).

Endocannabinoid system includes cellular receptors, endogenous ligands and enzymes that regulate the biosynthesis and degradation of ligands. One of its ligands is *N*-arachidonoyl dopamine (NADA), which seems to play an important role in neuroprotection processes because mediates important biological effects through receptor-dependent and receptor-independent mechanisms (CB<sub>1</sub> and TRPV1). Similarly, the *N*-acyl dopamines also regulate the metabolism of arachidonic acid to act as substrates or inhibitors of lipoxygenases.

Also, It has been reported that pharmacological inhibition of PHD (prolyl hydroxylase) protein induces activation of the transcription factor HIF-1 $\alpha$ , which is the central axis of the neuroprotective mechanism of these inhibitors (also called hipoximimetics agents). HIF-1 $\alpha$  modulates the transcription of genes involved in neuronal protection, and adaptive responses cause both neuronal and non-neuronal cells and in a variety of situations such as stroke and Parkinson's, Huntington's and Alzheimer's disease. Our results demonstrate how NADA and others *N*-acyl dopamines are able to induce the stabilization and activation of HIF-1 $\alpha$  in neuronal and non-neuronal lines and making it through the activation of E3 ubiquitin ligase protein SIAH2, which is responsible for the inhibition of protein PHD. This study explains at least one mechanism of action by which certain endocannabinoids have anti-inflammatory and neuroprotective effects. Furthermore, and most importantly, opens up new lines of research for the treatment of neurodegenerative and neuroinflammatory diseases.

Finally, the results obtained in this thesis have contributed to study the effect of NADA and others *N*-acyl dopamines on levels of HIF-1 $\alpha$  in different cell lines, characterizing the possible biochemical and molecular mechanisms by which is possible this stabilization, showing the role of ubiquitin ligase SIAH2 in the hipoximimetic action of NADA.



## *INTRODUCCIÓN*

---





### III.- INTRODUCCIÓN.

#### 1.- El sistema endocannabinoide.

El aislamiento del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), el principio activo psicotrópico, de la planta *Cannabis sativa* hace más de 40 años fue el primer hito en la ciencia moderna para descubrir lo que hoy conocemos como el Sistema Endocannabinoide (SE) (Mechoulam, 1970; Mechoulam & Gaoni, 1965). Este sistema está compuesto por receptores específicos (receptores cannabinoides), por ligandos endógenos denominados endocannabinoides y por enzimas que regulan la síntesis y degradación de estos últimos (Devane et al, 1988; Devane et al, 1992; Herkenham et al, 1991; Matsuda et al, 1990; Mechoulam et al, 1995; Sugiura et al, 1995) (Figura 1).

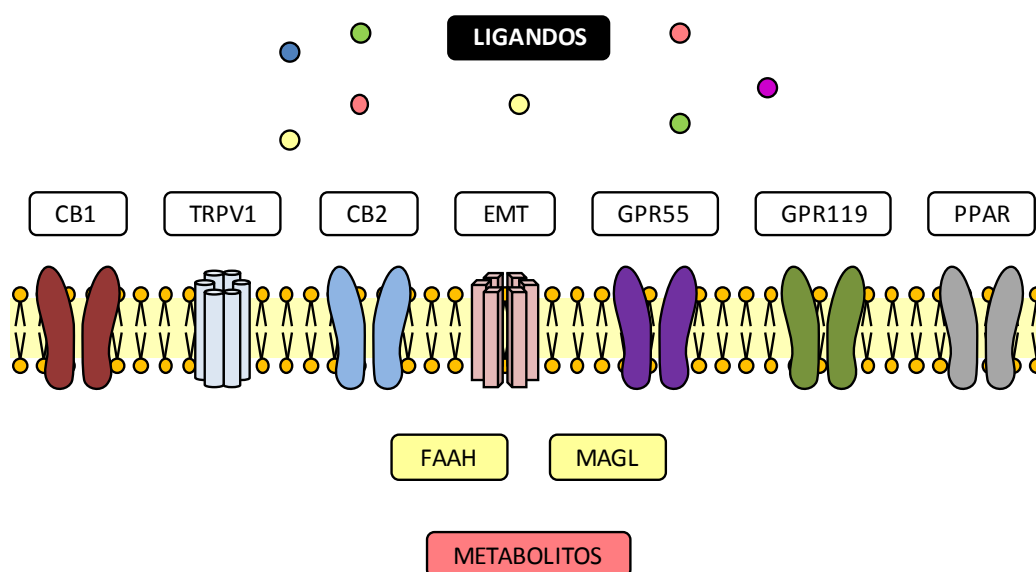


Figura 1. Esquema general del sistema endocannabinoide.

El SE constituye un nuevo sistema de comunicación y regulación celular que desempeña un papel modulador en diferentes procesos fisiológicos, principalmente en el cerebro y en el sistema inmune, aunque también juega un papel preponderante en otros sistemas regulando funciones fisiológicas claves. Por todo ello se considera que el mantenimiento de un tono endocannabinoide óptimo es esencial para la homeostasis del organismo y para la intercomunicación entre diferentes sistemas. En las dos últimas décadas se han acumulado evidencias muy importantes que muestran que la manipulación farmacológica del SE representa una excelente oportunidad para el tratamiento de un amplio abanico de patologías, donde destacan las enfermedades del Sistema Nervioso Central.

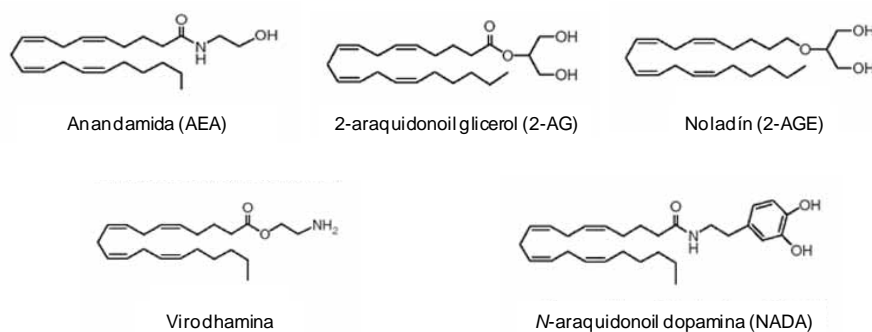
#### 1.1.- Endocannabinoides.

Los endocannabinoides son mediadores lipídicos que interaccionan con los receptores de cannabinoides clásicos, con otros tipos de receptores y también median su actividad por

mecanismos independientes de receptor. Estos mediadores son principalmente derivados del ácido araquidónico y se asemejan a otros transmisores lipídicos como son las prostaglandinas o los leucotrienos.

El primer endocannabinoide identificado fue la araquidonoil etanolamida, también denominada anandamida (AEA), nombre que viene de la palabra sánscrita “ananda” que significa “*el que trae bienaventuranza o felicidad*” (Devane et al, 1992). Este lípido se sintetiza bajo demanda a partir de los fosfolípidos de la membrana plasmática mediante un proceso dependiente de calcio, el cual es necesario para la activación de los sistemas enzimáticos implicados en su biosíntesis (Di Marzo et al, 1994). La AEA fue aislada por primera vez en cerebro porcino mostrando algunas propiedades biológicas similares a las observadas previamente con el THC. Este endocannabinoide se une a los receptores cannabinoides tipo 1 y 2 (CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>), aunque tiene más afinidad por CB<sub>1</sub> y, además de encontrarse en cerebro porcino, ha sido detectado también en cerebro humano y de rata, observándose las mayores concentraciones en hipocampo, córtex, tálamo y cerebelo (Di Marzo et al, 1994). Posteriormente se ha descrito que la AEA también es producida a nivel periférico, especialmente por macrófagos (Di Marzo et al, 1996). Esta molécula lipídica, sin ningún parecido con los neurotransmisores conocidos hasta el momento, comparte motivos estructurales con los eicosanoides, mediadores de la inflamación y el dolor que intervienen además en algunas funciones en la comunicación neuronal (Piomelli & Greengard, 1990). Aunque en un principio su papel en señalización fue controvertido, el descubrimiento de su ruta de síntesis y liberación en cerebro hizo que se confirmara la existencia de un importante rol fisiológico para esta molécula.

Tras la identificación de la AEA, fueron identificados otros endocannabinoides como el 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Mechoulam et al, 1995), el noladín (2-AGE) (Hanuš et al, 2001), la virodhamina (Porter et al, 2002) y la *N*-araquidonoil dopamina (NADA) (Huang et al, 2002b) (Figura 2), poniendo de manifiesto la complejidad del sistema endógeno cannabinoide. En este sentido, uno de los aspectos más interesantes para entender la función biológica de los endocannabinoides es el denominado “efecto entourage” por el cual la actividad de determinados endocannabinoides puede ser amplificada o regulada por otros compuestos de la misma naturaleza presentes en el tejido donde hacen su función.



**Figura 2. Endocannabinoides.** Estructura química de los ligandos endógenos del receptor de cannabinoides descritos hasta el momento.

## 1.2.- Receptores cannabinoides.

Debido a la alta lipofilicidad del THC, durante mucho tiempo se pensó que este compuesto producía sus efectos farmacológicos mediante interacciones inespecíficas a nivel de la membrana (Hillard et al, 1985). No fue hasta comienzos de la década de los 90, cuando se clonó el primer receptor de cannabinoides 1 (CB<sub>1</sub>) en cerebro de rata (Matsuda et al, 1990). Algunos años después se obtuvo la confirmación de la existencia de un segundo receptor (CB<sub>2</sub>) (Munro et al, 1993), mayoritariamente expresado en el sistema inmune. Así, basándose en su expresión predominante en el sistema nervioso central y en el sistema inmune periférico, CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> fueron inicialmente conocidos como receptor de cannabinoides central y periférico respectivamente. Tiempo después se constató que el CB<sub>1</sub> podía encontrarse también en terminaciones nerviosas periféricas y tejidos no neuronales como la glándula pituitaria, el endotelio vascular, las células del sistema inmune, el íleo y los tejidos reproductivos; y que el CB<sub>2</sub> se encuentra también expresado en sistema nervioso central y en otras localizaciones fuera del sistema inmune.

Los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, pertenecen a la familia de receptores cuya estructura incluye siete dominios tipo hélice insertos en la membrana celular, un dominio extracelular N-terminal glicosilado y un dominio intracelular C-terminal acoplado a sistemas de señalización intracelular mediados por proteínas G (Pertwee, 1997). Las proteínas G están formadas por tres tipos de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . En presencia de agonistas del receptor, la subunidad  $\alpha$  se une al GTP con alta afinidad provocando la disociación de las subunidades  $\beta\gamma$ , que activan diversos efectores intracelulares. La subunidad  $\alpha$  unida a GTP también se separa del receptor e hidroliza el GTP a GDP, aumentando la afinidad de  $\alpha$  por  $\beta\gamma$ , recomponiéndose la proteína G y permitiendo que se inicie un nuevo ciclo de activación. Cada receptor puede activar varias proteínas G por lo que se produce una amplificación de la señal tras la unión del agonista al mismo (Ji et al, 1998). Si bien hay varios tipos de proteínas G, son las proteínas inhibitoras tipo G<sub>i/o</sub> las que están asociadas a los receptores de cannabinoides (Pertwee, 1997).

Además de los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, también se han identificado otros receptores que también responden a fitocannabinoides o a endocannabinoides. Dentro de estos otros receptores se encuentra el receptor de vanilloides tipo 1 (TRPV1) (Caterina et al, 1997) y los receptores huérfanos acoplados a proteína G, GPR55 y GPR119 (Izzo & Sharkey, 2010). GPR55 es un receptor cannabinoide que comparte una baja secuencia de homología (10-15%) con CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Ross, 2009) y ha sido encontrado en el sistema nervioso central (SNC) (Sawzdargo et al, 1999) y tejido periférico de mamíferos (Brown & Robin Hiley, 2009). GPR119 también ha sido encontrado en varias especies de mamíferos (Fredriksson et al, 2003) y en humanos está expresado en páncreas, hígado y tracto gastrointestinal (Overton et al, 2008). La AEA activa el TRPV1 (Marzo & Petrocellis, 2010), el cual se encuentra expresado en fibras sensoriales periféricas y también en varios núcleos del SNC (Marinelli et al, 2003). Por último, los receptores nucleares PPAR ( $\alpha$  y  $\gamma$ ) son también activados por ciertos

endocannabinoides que pueden participar en la regulación de los lípidos y el metabolismo de la glucosa, así como en las respuestas inflamatorias (Gasperi et al, 2007; Pagano et al, 2008).

### 1.3.- Síntesis y degradación de los endocannabinoides.

Los primeros compuestos descubiertos, la AEA y el 2-AG, son dos de los endocannabinoides mejor estudiados. Ambos compuestos se sintetizan bajo demanda en respuesta a un aumento de los niveles de calcio intracelular, a partir de precursores fosfolipídicos que residen en la membrana celular. Ambos, AEA y 2-AG se unen a los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> con una afinidad similar, aunque algunos investigadores han observado que 2-AG muestra mayor afinidad por CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en comparación con la AEA (Jonsson et al, 2006). Tras su liberación de la célula, la AEA y el 2-AG pueden actuar sobre dianas moleculares de manera autocrina o paracrina, y su actividad se encuentra controlada por un proceso de recaptación celular. Se han descrito diferentes mecanismos posibles de recaptación celular, como la difusión simple, la endocitosis o el transporte mediado por un posible transportador de membrana (AMT), cuya estructura molecular sigue siendo desconocida (McFarland & Barker, 2004).

Una vez en el interior de la célula, los endocannabinoides son degradados rápidamente. La principal enzima catalizadora de la degradación de la AEA es la amida hidrolasa de ácidos grasos o FAAH, la cual hidroliza la AEA en ácido araquidónico (AA) y etanolamina. El 2-AG es convertido en AA y glicerol tanto por la FAAH como por la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL). Cabe destacar que los productos obtenidos de la degradación también poseen actividad biológica. Así, se ha demostrado que la etanolamina protege a las células de neuroblastoma contra la apoptosis (Matas et al, 2007) y que el AA puede metabolizarse de nuevo en leucotrienos y prostaglandinas con funciones importantes en procesos pro-inflamatorios y carcinogénicos (Fürstenberger et al, 2006). Existen también otras enzimas que, dependiendo del contexto celular, contribuyen al metabolismo de AEA y 2-AG. Así por ejemplo, tanto la ciclooxigenasa 2 (COX-2) como lipooxigenasas (LOXs) pueden utilizar ambos endocannabinoides (AEA y 2-AG) como sustratos (Kozak & Marnett, 2002), generando de esta manera metabolitos de tipo prostamidas, que a su vez funcionan como nuevos mediadores de señales. Otra enzima que ha sido propuesta es la NAAA (*N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase) que actuaría hidrolizando tanto a la AEA como a la PEA (*N*-palmitoil etanolamina) y la OEA (*N*-oleil etanolamina), aunque en condiciones de pH inferior a los de la FAAH (Blankman et al, 2007; Marrs et al, 2010; Tsuboi et al, 2005).

Para añadir mayor complejidad a este sistema, diversos derivados de ácidos grasos que poseen actividad farmacológica pero no mediada por la unión a receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, pueden potenciar la actividad de los endocannabinoides inhibiendo los procesos de recaptación o metabolismo, o actuando como sustratos para las enzimas involucradas en su transporte o degradación (Pertwee, 2005). Esta actividad es conocida como el efecto “*entourage*” de los endocannabinoides anteriormente comentado.

## **2.- *N*-acil dopaminas y *N*-araquidonoil dopamina.**

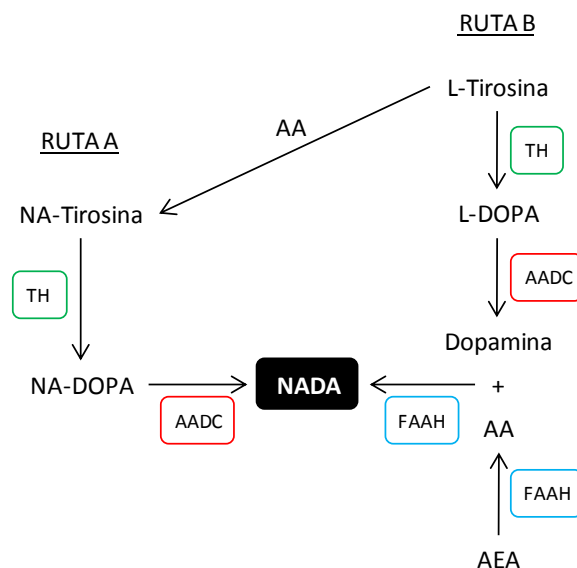
### **2.1.- *N*-acil dopaminas.**

Las *N*-acil dopaminas son compuestos generados a partir de la conjugación de un ácido graso con una molécula de dopamina a través de un enlace amida y son endolípidos señalizadores pertenecientes al sistema endocannabinoide/endovanilloide. Hasta la fecha se han encontrado en mamíferos amidas de dopamina conjugadas con AA (Huang et al, 2002b), ácido oleico, ácido esteárico y ácido palmítico (Chu et al, 2003). Los efectos de la señalización de las *N*-acil dopaminas se manifiestan principalmente en el sistema nervioso y en el sistema inmune realizándolo a través de la interacción con los receptores CB<sub>1</sub> y TRPV1 (Chu et al, 2003; Huang et al, 2002b; Starowicz et al, 2007) y también por mecanismos independientes de estos receptores (Navarrete et al, 2009; Navarrete et al, 2010; Sancho et al, 2004). Se ha propuesto que estos compuestos y en particular la *N*-araquidonoil dopamina (NADA) juegan un papel relevante en la función del SE y por tanto pueden representar nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de diferentes patologías (Bisogno et al, 2000).

### **2.2.- *N*-araquidonoil dopamina.**

*N*-araquidonoil dopamina (NADA) ha sido identificada como un compuesto endógeno tipo capsaicina que ha mostrado ser agonista a concentraciones nanomolares de los receptores CB<sub>1</sub> y TRPV1. Este endolípido ha sido detectado en áreas cerebrales con una alta densidad de TRPV1, como por ejemplo, el cuerpo estriado, el hipocampo, el cerebelo y los ganglios dorsales de la médula espinal (Bezuglov et al, 2001; Bisogno et al, 2000; Huang et al, 2002b).

Debido a su acción dual como endocannabinoide y endovanilloide el NADA pudiera tener un papel relevante en la nocicepción y en la neuroinflamación a través de la activación de los receptores CB<sub>1</sub> y TRPV1. Por lo tanto, es importante conocer su ruta de biosíntesis y su catabolismo y hasta la fecha se han propuesto varias rutas posibles para la biosíntesis de NADA. Una primera posibilidad es que el NADA pueda ser sintetizado partiendo de *N*-araquidonoil tirosina que se convierte en *N*-araquidonoil-DOPA y esta en NADA por las enzimas tirosina hidroxilasa (TH) y L-amino ácido descarboxilasa (AADC) que son las mismas que intervienen en la conversión de la tirosina en dopamina también en dos pasos. Alternativamente, se ha sugerido también que el NADA se puede formar por la conjugación directa de dopamina preformada con ácido araquidónico a través de la acción de la FAAH (Figura 3) (Hu et al, 2009).

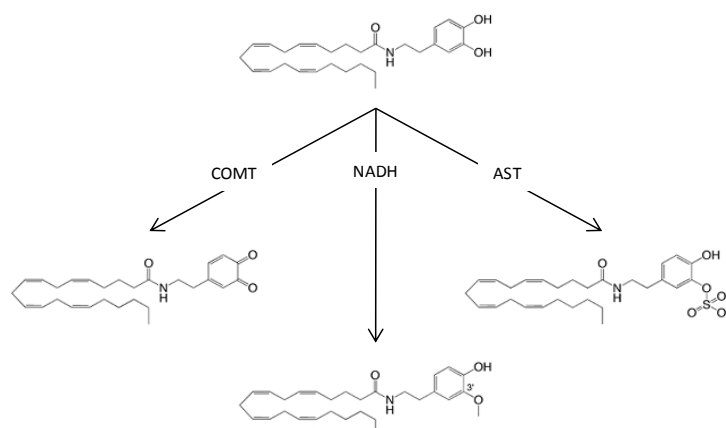


**Figura 3. Representación esquemática de las rutas de biosíntesis de *N*-araquidonoil dopamina.** La ruta A muestra la síntesis a partir de *N*-araquidonoil tirosina mediante la intervención de las enzimas tirosina hidroxilasa (TH) y aminoácido descarboxilasa (AADC). La ruta B muestra la síntesis a partir de la unión de ácido araquidónico (AA) y dopamina con intervención de la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH).

Apoyando a esta hipótesis se ha observado que un compuesto con propiedades cromatográficas idénticas al NADA podía ser biosintetizado en homogenados de cerebro de rata incubados con ácido araquidónico y dopamina o tirosina. Además, la formación de este compuesto parecido al NADA a partir de la tirosina se reduce al inhibirse la enzima TH lo cual da una evidencia de que esas rutas son las que producen la biosíntesis de NADA (Huang et al, 2002b). En cualquiera de los casos anteriores, la conjugación de la dopamina o la tirosina con el ácido araquidónico puede ocurrir por condensación directa o mediante una previa formación de araquidonoil-CoA el cual sería más reactivo al ataque nucleofílico por el grupo NH<sub>2</sub> de las aminas. Finalmente, el NADA también puede ser formado en principio por la aminólisis inducida por dopamina del enlace éster del araquidonoil glicerol de fosfolípidos (Pajouhesh & Hancock, 1984), o bien su síntesis podría utilizar como precursor biosintético un pool de ácido araquidónico esterificado en los fosfolípido en lugar de ácido araquidónico libre o activado con CoA.

En mamíferos, las *N*-acil dopaminas podrían ser metabolizadas a través de una hidrólisis de muy baja eficiencia mediada por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Chu et al, 2003; Huang et al, 2002b), a través de oxidación de la dopamina por la NADH oxidorreductasa de la membrana plasmática y las mitocondrias (Akimov et al, 2007) y a través de metilación del grupo catecol por una catecol-O-metiltransferasa (COMT) citoplasmática (Akimov et al, 2007; Huang et al, 2002b). Los ácidos grasos influyen en un mal reconocimiento del grupo catecol de las *N*-acil dopaminas por las enzimas, por lo que se ha supuesto que existe otro sistema enzimático responsable de la inactivación de la dopamina que podría estar implicado en el metabolismo de las *N*-acil dopaminas (Figura 4). Este sistema está representado por las aril sulfotransferasas (ASTs), enzimas las cuales están ampliamente

distribuidas en tejidos de mamíferos (Campbell et al, 1987; Eisenhofer et al, 1999) y que transfieren grupos sulfato a grupos hidroxilo aceptores. Algunas isoformas de las AST son conocidas por tener sustratos específicos como los carbohidratos, proteínas, fenoles y catecolaminas y otras son conocidas por ser isoformas específicas de tejidos. Todas estas enzimas, están localizadas de manera general en el citoplasma de las células. La actividad de las AST específicas de fenoles y catecolaminas incrementa la solubilidad de compuestos fenólicos que facilitan su eliminación del cuerpo y también inhiben los efectos fisiológicos de la dopamina exógena. Aunque el sulfato de dopamina ha sido encontrado en plasma sanguíneo y líquido cerebrospinal de mamíferos, su papel biológico no está todavía aclarado (Eldrup, 2004).



**Figura 4. Sistemas de biodegradación de *N*-araquidonoil dopamina.** Las enzimas COMT, NADH oxidoreductasa y aril sulfotransferasas pueden participar en la degradación de *N*-araquidonoil dopamina mediante la transformación a diferentes intermediarios. También es posible la hidrólisis a ácido araquidónico y dopamina con una posible intervención de FAAH.

### 3.- Homeostasis del oxígeno.

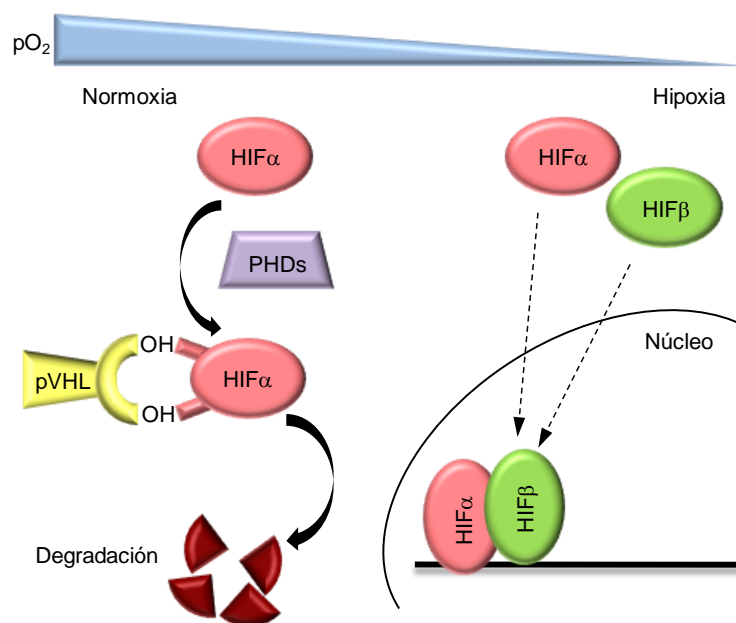
La normoxia se define como el nivel de oxígeno requerido para que se produzcan con normalidad los diferentes procesos fisiológicos (Maltepe & Saugstad, 2009). El incremento o disminución de la disponibilidad de oxígeno resulta en un estado de hiperoxia o de hipoxia respectivamente. La hiperoxia ocurre fisiológicamente como resultado de una excesiva angiogénesis, y clínicamente cuando se suministra en altas concentraciones de  $O_2$  a pacientes. La hipoxia por el contrario, es un estímulo fisiológico fundamental que está presente especialmente en respuesta al crecimiento de los tejidos durante el desarrollo embrionario, y de manera patológica en algunas enfermedades como el cáncer, la anemia, hemorragias y neumonía (Semenza, 2009). La hipoxia implica un desequilibrio entre el oxígeno suministrado y el demandado, capaz de desencadenar una cascada de eventos fisiológicos y bioquímicos para compensar esta situación (Maltepe & Saugstad, 2009). La hipoxia puede ocurrir tanto de manera continua como de manera intermitente, llegando a ser incluso aguda o crónica en duración. Mientras que la hipoxia crónica continua puede ocurrir en un contexto fisiológico o patológico, la hipoxia crónica intermitente solo ocurre de manera generalizada dentro de un contexto patológico (Semenza, 2009).



### 3.1.- Ruta de respuesta a hipoxia.

Las células responden a los niveles bajos de oxígeno activando un programa génico específico que incluye genes encargados de adaptarse al metabolismo anaeróbico, genes para potenciar el suministro de sangre y otro gran número encargados de la conservación de la energía. En este programa, el papel clave lo llevan a cabo los factores de transcripción HIF (del inglés Hypoxia Inducible Factor) responsables de la regulación de la mayor parte de estos genes (Brahimi-Horn et al, 2007; Semenza, 2001).

De manera resumida, el factor de transcripción HIF es un heterodímero compuesto de 2 subunidades: HIF $\alpha$  y HIF $\beta$ . La actividad de la subunidad HIF $\alpha$  está regulada por oxígeno, mientras que por el contrario la subunidad HIF $\beta$  se encuentra constitutivamente expresada. En presencia de oxígeno, una familia de dioxigenasas denominadas prolihdroxilasas (PHDs), hidroxilan unos residuos específicos de prolina de los factores HIF $\alpha$ . Estos motivos hidroxilados son reconocidos por la proteína pVHL (proteína Von Hippel-Lindau), la cual forma parte del complejo E3 ubiquitina ligasa que marca al factor HIF $\alpha$  para su poliubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma (Lonser et al, 2003). En condiciones de hipoxia, los residuos de prolina de HIF $\alpha$  no se hidroxilan y por tanto no son reconocidos por pVHL, permitiendo que el factor HIF $\alpha$  no se degrade. La acumulación de HIF $\alpha$  permite formar un complejo con la subunidad HIF $\beta$  para translocarse al núcleo y modular de esta manera la expresión de los diferentes genes diana (Figura 5).



**Figura 5. Esquema de la ruta de respuesta a hipoxia.** En condiciones normales de oxígeno, HIF $\alpha$  es ubiquitinada y degradada rápidamente. Las enzimas prolihdroxilasas (PHDs) hidroxilan los residuos de prolina de HIF $\alpha$ , lo que permite su reconocimiento por pVHL y su posterior degradación. A niveles bajos de oxígeno, las PHDs no catalizan la hidroxilación de los residuos de prolina y, por tanto, HIF $\alpha$  no es degradada. El complejo formado por HIF $\alpha$  y HIF $\beta$  se transloca al núcleo activando la expresión de genes diana.

### 3.2.- Factor inducible por hipoxia.

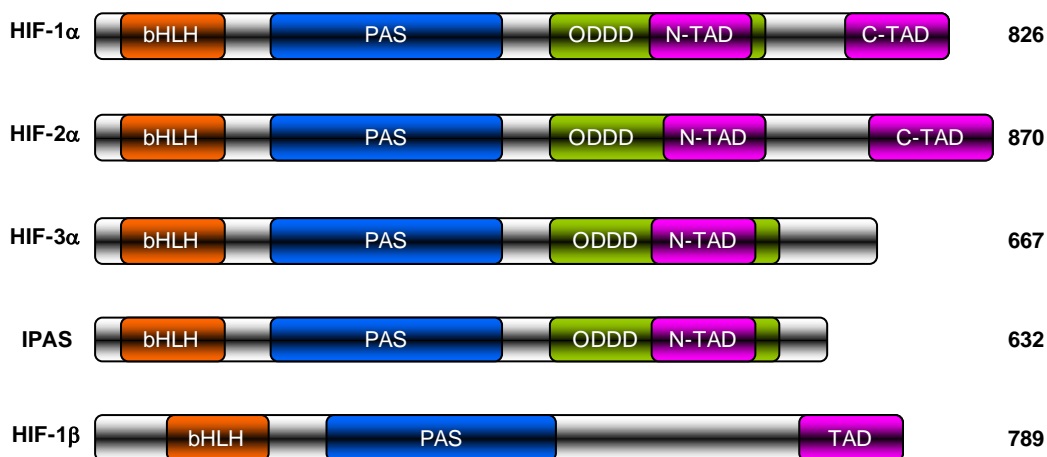
Debido al fuerte impacto que tiene en la fisiología de los mamíferos, y más especialmente por su papel en enfermedades humanas tales como el cáncer y la enfermedad isquémica, ha habido durante la última década un creciente interés en el conocimiento detallado de la regulación de la ruta de HIF. Este factor de transcripción fue descubierto tras la identificación de los elementos de respuesta a hipoxia (HRE: Hypoxia Response Elements; 5'-RCGTG-3') en el promotor del gen de la eritropoyetina (EPO), una hormona que estimula la proliferación de eritrocitos y cuya transcripción está estimulada por la falta de oxígeno (Goldberg et al, 1988; Semenza et al, 1991). Como ya hemos comentado anteriormente, el factor HIF está formado por un complejo heterodimérico consistente en una subunidad inducible por hipoxia, HIF $\alpha$ , y una subunidad expresada constitutivamente, HIF $\beta$  (Wang et al, 1995). Estas proteínas pertenecen a la familia de proteínas basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) (Wang et al, 1995). Los dominios bHLH y PAS son requeridos para la formación del heterodímero entre las subunidades HIF $\alpha$  y HIF $\beta$ , lo que favorece la configuración espacial de los dominios de interacción al ADN y por tanto su unión a la secuencia HRE presente en los genes diana (Crews, 1998). En humanos existen 3 genes que codifican distintas isoformas de HIF $\alpha$ . HIF1A codifica HIF-1 $\alpha$ , EPAS1 codifica a HIF-2 $\alpha$  y HIF3A se expresa como múltiples variantes de HIF-3 $\alpha$  (Makino et al, 2002; Maynard et al, 2003; Wang et al, 1995) (Figura 6).

HIF-1 $\alpha$  posee dos dominios de transactivación, denominados N-terminal (N-TAD) y C-terminal (C-TAD), presentes en la mitad C-terminal de la proteína (Ruas et al, 2002). El dominio C-TAD interacciona con coactivadores como CBP/p300 para activar la transcripción de genes (Lando et al, 2002). HIF-1 $\alpha$  también contiene un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD: Oxygen-dependent degradation domain) que regula la estabilidad de la proteína mediada por oxígeno (Pugh et al, 1997). HIF-1 $\alpha$  está expresada ubicuamente en tejidos humanos y de ratón, y tiene un papel fundamental en múltiples respuestas fisiológicas a la hipoxia tales como la eritropoyesis, glicolisis y angiogénesis (Semenza, 1998).

HIF-2 $\alpha$  fue identificada poco después de la clonación de HIF-1 $\alpha$ , compartiendo un 48% de identidad, además de grandes similitudes bioquímicas y estructurales como por ejemplo la dimerización con HIF-1 $\beta$  y la unión a HREs. A diferencia de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  está expresada de forma predominante en pulmón, endotelio y cuerpo carotídeo (Ema et al, 1997; Tian et al, 1998; Tian et al, 1997).

HIF-3 $\alpha$  fue la última en ser descubierta, está también expresada en varios tejidos, dimeriza con HIF-1 $\beta$  y se une a los elementos HRE (Gu et al, 1997). Existe una variante de HIF-3 $\alpha$  llamada PAS inhibitoria (IPAS), la cual se expresa predominantemente en las células de Purkinje del cerebelo y epitelio corneal. Esta variante no posee ninguna actividad de transactivación endógena, más bien, interactúa con la región amino terminal de HIF-1 $\alpha$  y

previene su unión al ADN, actuando como un regulador dominante negativo de HIF-1 $\alpha$  (Makino et al, 2001). Sin embargo, IPAS puede también ser inducido por hipoxia en corazón y pulmones, contribuyendo a una retroalimentación negativa para la actividad de HIF en esos tejidos (Makino et al, 2002).



**Figura 6. Estructura de las proteínas HIF $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  de humanos.** HIF $\alpha$  (isoformas HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  y IPAS) y HIF-1 $\beta$  pertenecen a la familia de proteínas bHLH y PAS. HIF $\alpha$  contiene un dominio ODDD que media la estabilidad regulada por oxígeno. HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  dos dominios de transactivación (C-TAD y N-TAD), mientras que HIF-3 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  solo tienen un TAD. El número total de aminoácidos de cada subunidad se marca en el extremo de la estructura.

### 3.3.- Regulación del factor inducible por hipoxia.

Aunque HIF-1 $\beta$  se expresa constitutivamente y su ARNm y proteína se mantienen a niveles constantes independientemente de la disponibilidad de oxígeno (Kallio et al, 1997), HIF-1 $\alpha$  tiene una vida media corta (aproximadamente 5 minutos) y está altamente regulada por los niveles de oxígeno (Salceda & Caro, 1997). Aunque la transcripción y síntesis de HIF-1 $\alpha$  ocurren de manera constitutiva y parecen no verse afectadas por el oxígeno (Kallio et al, 1997; Wang et al, 1995; Wiesener et al, 1998), en normoxia, la proteína HIF-1 $\alpha$  es rápidamente degradada resultando en una proteína no detectable (Wang et al, 1995). Por el contrario, en hipoxia HIF-1 $\alpha$  consigue estabilizarse y se transloca desde el citoplasma al núcleo, donde es capaz de dimerizar con HIF-1 $\beta$  llegando a ser activos los complejos HIF formados (Huang et al, 1996; Kallio et al, 1997). Por lo tanto, esta regulación de la estabilidad y posterior actividad de HIF-1 $\alpha$  está principalmente controlada por modificaciones post-traduccionales, destacando principalmente la hidroxilación y ubiquitinación (Brahimi-Horn et al, 2005).

En un primer paso en la regulación de los niveles de HIF-1 $\alpha$ , las nuevas moléculas sintetizadas son rápidamente hidroxiladas por una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato (2-OG) en prolina 402 (Pro402) y 564 (Pro564), localizadas en el dominio ODDD (Masson & Ratcliffe, 2003; Masson et al, 2001; Srinivas et al, 1999). Estos residuos de prolina están igualmente conservados en HIF-2 $\alpha$  (Pro405 y Pro530) y HIF-3 $\alpha$ . La dioxigenasa humana de HIF $\alpha$  se denomina dioxigenasa de dominio proil hidroxilasa (PHD: Prolyl hydroxylase domain),

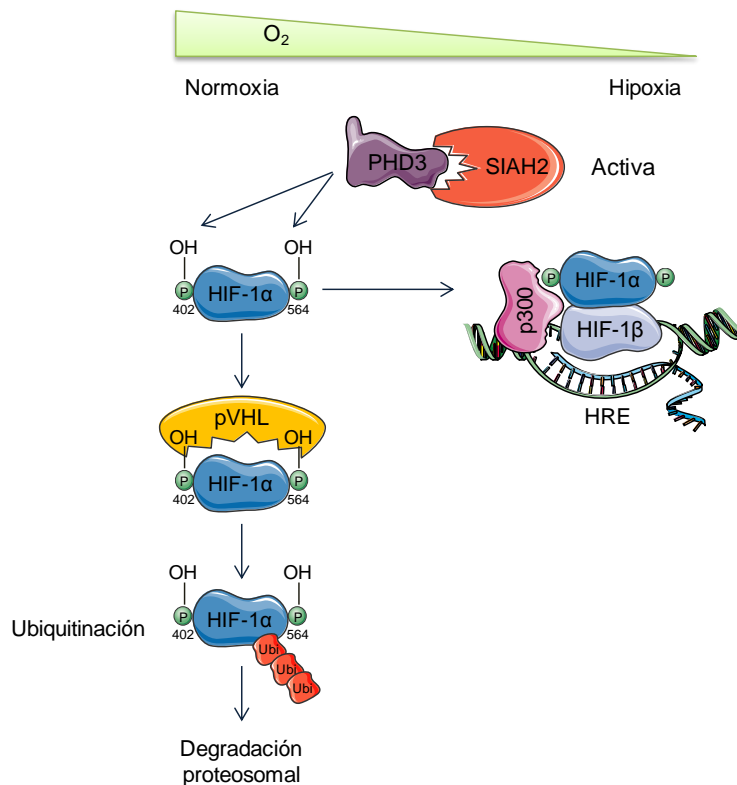
prolil hidroxilasa de HIF (HPH: HIF prolyl hydroxylase) o Egg-laying Nine (EGLN) y se han identificado tres isoformas: PHD1/HPH3/EGLN2, PHD2/HPH2/EGLN1 y PHD3/HPH1/EGLN3 (Bruick & McKnight, 2001; Epstein et al, 2001; Huang et al, 2002a). El proceso de hidroxilación consiste en dividir una molécula de  $O_2$  transfiriéndose uno de los oxígenos a la prolina reaccionando el otro con el 2-OG para generar succinato y  $CO_2$  (Bruick & McKnight, 2001; Masson & Ratcliffe, 2003). En presencia de oxígeno, las PHDs son activas e hidroxilan a las prolinas de HIF-1 $\alpha$ , constituyendo una señal de reconocimiento para la unión de pVHL y su posterior ubiquitinación, seguido por la degradación de HIF-1 $\alpha$  (Ivan & Kaelin Jr, 2001; Jaakkola et al, 2001). La ausencia de oxígeno no causa actividad enzimática, no modifica las prolinas y no se produce la unión pVHL/HIF, resultando en una estabilización de HIF-1 $\alpha$  y acumulación en la célula (Epstein et al, 2001). El requerimiento absoluto de oxígeno como cosustrato ha servido para definir a las PHDs como los sensores de oxígeno de las células (Epstein et al, 2001).

Aunque la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$  regula la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , no es suficiente para completar su capacidad transcripcional. El segundo mecanismo principal para controlar la actividad de HIF se lleva a cabo mediante la modulación de sus dominios de transactivación N-TAD y C-TAD. Estos dominios son los encargados de reclutar a co-activadores transcripcionales como CBP/p300, SRC-1 y TIF2 (Arany et al, 1996; Carrero et al, 2000; Ebert & Bunn, 1998; Ema et al, 1999; Kallio et al, 1997). Bajo presión normal de oxígeno, la hidroxilación del residuo de asparagina 803 (Asn803) en el C-TAD de HIF-1 $\alpha$  (Asn851 en HIF-2 $\alpha$ ) por el factor de inhibición de HIF-1 (FIH-1) previene la interacción de HIF-1 $\alpha$  con CBP/p300 (Hewitson et al, 2002; Lando et al, 2002; Sang et al, 2002). FIH-1 está localizada principalmente en el citoplasma. Su transcripción es independiente de la concentración de oxígeno y no influye en la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  (Metzen et al, 2003). Al igual que las PHDs, FIH-1 es una dioxigenasa dependiente de 2-OG. La utilización de oxígeno como sustrato permite a FIH-1 servir como un segundo sensor de oxígeno (Lando et al, 2002).

Una vez que los dos residuos de prolina de HIF-1 $\alpha$  se han convertido en hidroxiprolina, la proteína pVHL puede capturar a HIF-1 $\alpha$  (Hon et al, 2002; Min et al, 2002). pVHL se asocia con las proteínas elongina C, elongina B, culina 2 y Rbx1 para formar el complejo E3 ligasa VCB-Cul2 (Ivan & Kaelin Jr, 2001). La unión de HIF-1 $\alpha$  a este complejo E3 multiproteico causa la poliubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  permitiendo su degradación por el proteosoma (Kamura et al, 2000). El complejo E3 ligasa pVHL se expresa ubicuamente en diferentes tejidos y está predominantemente localizado en el citoplasma. Su movimiento entre citoplasma y núcleo permite la degradación de HIF-1 $\alpha$  en ambos compartimentos (Berra et al, 2001; Groulx & Lee, 2002). Además de pVHL, otras proteínas han sido descritas que afectan a la ubiquitinación y estabilidad de HIF-1 $\alpha$ . Por ejemplo, la E3 ubiquitina ligasa oncogénica doble minuto murina (MDM2) lleva a cabo la ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  de una manera dependiente de p53 (Ravi et

al, 2000). La proteína Jab1, un coactivador transcripcional de c-Jun y JunD, también se ha mostrado que incrementa los niveles de HIF-1 $\alpha$  en hipoxia (Bae et al, 2002).

De entre los mecanismos de control de la expresión de las PHDs en respuesta a hipoxia descrita hasta la actualidad, la degradación mediada por SIAH2 (*seven in absentia* homolog 2) es hasta la actualidad el paso más temprano conocido (Nakayama & Ronai, 2004; Pouyssegur et al, 2006). En respuesta a hipoxia, se incrementan rápidamente los niveles de ARNm de SIAH2, un aumento que también se observa en condiciones de hipoxia leve (5% O<sub>2</sub>). SIAH2 es capaz de interactuar con las proteínas PHD1, PHD2 y PHD3, produciéndose una importante degradación de PHD3 y en menor grado de PHD1 (Figura 7). Curiosamente, y aunque PHD2 también se encuentra asociada a SIAH2, la estabilidad de esta no se ve afectada. Entre los mecanismos que subyacen a la selección de PHD3 y PHD1, pero no de PHD2, está la distinta localización subcelular. Dado que PHD3 regula la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  a través de la hidroxilación, los niveles de HIF-1 $\alpha$  se ven significativamente reducidos en células carentes de SIAH2 y la inducción de los genes diana de HIF-1 $\alpha$ , como VEGF, también se ve disminuida en respuesta a hipoxia (Nakayama & Ronai, 2004; Pouyssegur et al, 2006).



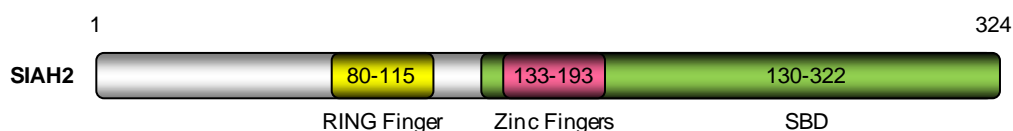
**Figura 7. Esquema detallado de la ruta de respuesta a hipoxia dependiente de SIAH2.** En condiciones normales de oxígeno, HIF-1 $\alpha$  es ubiquitinada y degradada rápidamente. Primero, la enzima prolil hidroxilasa 3 (PHD3) hidroxila los residuos de prolina 402 y 564 de HIF-1 $\alpha$ , lo que permite su reconocimiento por la ubiquitina ligasa E3 pVHL, llevando a cabo su ubiquitinación y posterior degradación proteosómica. A niveles bajos de oxígeno, PHD3 no puede catalizar la hidroxilación de los residuos de prolina porque es degradada por la ubiquitina ligasa E3 SIAH2 y por tanto, HIF-1 $\alpha$  no es degradado permitiéndose su migración al núcleo y dimerizar con HIF-1 $\beta$ . El complejo formado por HIF $\alpha$ , HIF $\beta$  y CBP/p300 se une al ADN y activa la expresión de genes diana.

#### 4.- SIAH (Seven In Absentia Homolog).

Las proteínas SIAH (*seven in absentia* homolog) pertenecen a la familia de las E3 ubiquitina ligasas RING (really interesting new gene) finger. Estas proteínas están involucradas en la ubiquitinación y posterior degradación proteosomal de sustratos específicos (Lorick et al, 1999; Schnell & Hicke, 2003; Tang et al, 1997). El primer miembro de esta familia fue descubierto inicialmente en *Drosophila melanogaster* y se denominó como *seven in absentia* (sina), una proteína necesaria para el correcto desarrollo del fotorreceptor R7 (Carthew et al, 1994; Li et al, 1997). Posteriormente, otros tres genes fueron descubiertos en ratón, Siah1a, Siah1b y Siah2 (Della et al, 1993; Holloway et al, 1997). En humanos esta familia está formada por dos subunidades, SIAH1 y SIAH2, que poseen funciones similares y redundantes pero que están codificadas por genes diferentes (Hu et al, 1997a; Lorick et al, 1999; Schnell & Hicke, 2003; Tang et al, 1997). Los ratones knock-out de Siah2 muestran fenotipos aberrantes, como el acúmulo de precursores hematopoyéticos. Por el contrario, los ratones dobles mutantes para Siah1 y 2 mueren en la etapa fetal, demostrando un papel esencial en la embriogénesis, y poniendo de manifiesto la función parcialmente redundante de Siah1 y Siah2 *in vivo* (Frew et al, 2003).

##### 4.1.- SIAH2.

En humanos, SIAH2 es una proteína dimérica de 324 aminoácidos. En su centro catalítico presenta el dominio RING que está en el extremo N-terminal, este es el encargado de unir a las proteínas E2 de conjugación de ubiquitina. También, en el extremo C-terminal, presenta dos estructuras en dedos de zinc y un dominio de unión a sustrato (SBD, substrate-binding domain) (Figura 8) (House et al, 2006; Polekhina et al, 2001). Sus funciones están relacionadas con la regulación de la apoptosis, el control de la carcinogénesis y ciclo celular, la transcripción y la señalización celular.



**Figura 8. Estructura de SIAH2.** La proteína SIAH2 de mamíferos está constituida por 324 aminoácidos. Presenta un dominio RING en el extremo N-terminal (del aminoácido 80 al 115), lugar por donde se unen las proteínas E2 de conjugación de ubiquitina y dos estructuras de dedos de zinc entre los aminoácidos 133 y 193. Por último, presenta un dominio de unión a sustrato (SBD) entre los aminoácidos 130 y 322.

SIAH2 se codifica en dos exones separados mediante un intrón de 19,8 Kb. Este gen se sitúa en el cromosoma 3q25 y se expresa a bajos niveles, pero uniformes, con mayor presencia en tejidos adultos. Se expresa en un nivel superior en el epitelio olfatorio, retina, cerebro anterior y en cartílago de hueso en desarrollo (Della et al, 1993). El ARNm de SIAH2 también se expresa en la mayoría de los tejidos humanos. SIAH2 está presente en el 100% de los cánceres analizados, lo que revela que la expresión de SIAH2 no está sustancialmente alterada en cáncer, requiriendo una mayor aproximación experimental para comprobar las

posibles mutaciones presentes en su secuencia (Hu et al, 1997a). SIAH2 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma. Sin embargo, las formas fosforiladas de SIAH2 son exclusivas del núcleo y de la región perinuclear, lo que relaciona la función de esta ubiquitina ligasa con proteínas localizadas en esta zona intracelular (Khurana et al, 2006).

La expresión y actividad de SIAH2 está regulada a diferentes niveles. Se ha descrito que los niveles de SIAH2 son modulados a nivel transcripcional por estrógenos (Frasor et al, 2005) y en respuesta a factores de transcripción tales como WNT5 y E2F1 (Topol et al, 2003; Xie et al, 2009). En el mismo sentido, el microARN no codificante MiR-146b se une al ARNm de SIAH2 para degradarlo en respuesta a la señalización por TGF $\beta$  (Liao et al, 2013). A nivel de proteína, diferentes modificaciones post-traduccionales han sido descritas para SIAH2, siendo la más relevante bajo condiciones fisiológicas normales su capacidad de controlar su disponibilidad y actividad por auto-ubiquitinación (Hu & Fearon, 1999). Bajo condiciones de estrés, los niveles de SIAH2 podrían ser modulados por fosforilación llevada a cabo por quinasas. Por ejemplo, SIAH2 es fosforilada por la MAPK p38, incrementando su capacidad para degradar PHD3 (Khurana et al, 2006). Por otro lado, existen dos miembros de la familia de quinasas DYRK (dual-specificity tyrosine-regulated kinases), HIPK2 y DYRK2 que inducen una gran fosforilación de SIAH2 modificando su actividad (Calzado et al, 2009; Pérez et al, 2012). Por otro lado, también se han descrito varios péptidos capaces de modificar la actividad de SIAH2 (Möller et al, 2008; Stebbins et al, 2013). Sin embargo, la vitamina K3 (menadiona) es hasta la fecha el único compuesto químico descrito capaz de afectar los niveles de SIAH2 y su actividad a través de un mecanismo independiente de redox (Shah et al, 2009). La capacidad de la enzima desubiquitinasa USP13 ha sido descrita y se muestra capaz de incrementar la estabilidad de SIAH2 mediante la atenuación de la actividad de degradación tanto sobre sí misma como sobre PHD3 y Sprouty2 (Scortegagna et al, 2011). En líneas celulares de cáncer de mama, la quinasa Src tiene capacidad de activar SIAH2 mediante la fosforilación de tirosinas (Sarkar et al, 2012).

SIAH2 puede llevar a cabo su función como E3 ubiquitina ligasa de manera directa (Calzado et al, 2009; Sarkar et al, 2012) o mediante proteínas adaptadoras como SIP (SIAH interacting protein) o PHYL (phyllopod-link proteins) (Li et al, 2002; Matsuzawa & Reed, 2001). Un gran número de sustratos de SIAH2 han sido descritos hasta la actualidad, los cuales están implicados en importantes rutas de señalización (tabla 1).

SUSTRATO	Referencia	SUSTRATO	Referencia
$\alpha$ -sinucleína	(Liani et al, 2004)	Pard3A	(Famulski et al, 2010)
$\beta$ -catenina	(Topol et al, 2003)	PCAF	(Grishina et al, 2012)
ACK1	(Buchwald et al, 2012)	PHDs	(Nakayama et al, 2004)
AKAP121	(Carlucci et al, 2008)	PLC $\epsilon$	(Yun et al, 2008)
C/EBP $\delta$	(Sarkar et al, 2012)	PML	(Fanelli et al, 2004)
CBP/p300	(Grishina et al, 2012)	PPAR	(Kilroy et al, 2012)
DCC	(Hu et al, 1997b)	repp86	(Szczepanowski et al, 2007)
DYRK2	(Pérez et al, 2012)	Spry2	(Nadeau et al, 2007)
HDAC3	(Zhao et al, 2010)	TIN2	(Bhanot & Smith, 2012)
HIPK2	(Calzado et al, 2009)	Tip60	(Grishina et al, 2012)
MYPT1	(Twomey et al, 2010)	TRAF2	(Habelhah et al, 2002)
N-CoR	(Zhang et al, 1998)	USP13	(Scortegagna et al, 2011)
OGDHC-E2	(Habelhah et al, 2004)		

**Tabla 1. Sustratos de SIAH2.** Algunos de los sustratos más importantes de SIAH2 que intervienen en rutas de señalización.

SIAH2 se ha descrito como una proteína clave en el control de procesos relacionados con la carcinogénesis e inflamación (House et al, 2006; House et al, 2009; Kim et al, 2011; Nakayama & Ronai, 2004; Qi et al, 2008). El importante papel que juega SIAH2 en la progresión de múltiples tipos de cáncer, incluyendo el de garganta, pancreático, pulmón, próstata y melanoma, es evidenciado por la inhibición de estos tumores en modelos experimentales consecuencia de la atenuación de la actividad de SIAH2 (Ahmed et al, 2008; Behling et al, 2011; Möller et al, 2008; Qi et al, 2008; Qi et al, 2010; Schmidt et al, 2007). No obstante, de entre las funciones descritas en las cuales SIAH2 está involucrada, es sin duda en la respuesta celular a hipoxia donde juega su papel más relevante, siendo la degradación de PHDs dependiente de SIAH2 el primer paso de esta ruta identificado hasta la fecha (Nakayama & Ronai, 2004; Pouyssegur et al, 2006).

## 5.- Implicaciones biológicas y fisiopatológicas de la modulación de HIF-1 $\alpha$ .

### 5.1.- Implicaciones biológicas de la modulación de HIF-1 $\alpha$ .

Hasta la fecha se han descrito más de un centenar de genes dependientes de HIF, con funciones variables e implicaciones en diferentes procesos biológicos (Manalo et al, 2005) (Figura 9). Es el control de la expresión de estos genes lo que determina el papel que juega este factor de transcripción en diferentes procesos fisiológicos, entre los que destacan:

- **Eritropoyesis y metabolismo del hierro:** Es seguramente la respuesta fisiológica más importante que se produce como consecuencia de la modulación de este factor de transcripción. En respuesta a hipoxia, la capacidad de las células rojas sanguíneas para transportar oxígeno se regula por la expresión de genes involucrados en la eritropoyesis y en el metabolismo del hierro. La hipoxia incrementa la expresión de EPO, la cual es requerida para la formación de células rojas sanguíneas (Semenza et al, 1991). Un aumento en el número de eritrocitos incrementa el suministro de oxígeno a los tejidos. Los productos de los genes del



metabolismo del hierro controlan el paso limitante de la velocidad eritropoyética en la producción del grupo hemo. La hipoxia aumenta la expresión de transferrina (Tf), encargada de transportar el  $\text{Fe}^{3+}$  en las células (Rolfs et al, 1997), del receptor de la transferrina (Tfr), al que se une la Tf y permite la absorción celular de la misma (Bianchi et al, 1999; Lok & Ponka, 1999; Tacchini et al, 1999), y de la ceruloplasmina (también conocida como ferroxidasa), que es requerida para oxidar el hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Lok & Ponka, 1999; Mukhopadhyay et al, 2000). El incremento de estos genes favorece el suministro de hierro en tejidos eritroides (Rolfs et al, 1997).

- **Angiogénesis:** Se trata un complejo proceso que involucra múltiples productos de genes expresados por diferentes tipos celulares (Conway et al, 2001), muchos de los cuales se incrementan en respuesta a hipoxia (Berra et al, 2000; Bunn & Poyton, 1996; Forsythe et al, 1996; Giordano & Johnson, 2001; Levy et al, 1995; Semenza, 2002). Entre ellos, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el mitógeno endotelial específico más potente, y participa directamente en la angiogénesis por reclutamiento de células endoteliales en áreas hipóxicas y avasculares, además de estimular su proliferación (Conway et al, 2001; Joško et al, 2000; Neufeld et al, 1999). La inducción de VEGF y de otros factores pro-angiogénicos en respuesta a hipoxia conduce a un incremento en la densidad vascular y por ello a una disminución en la distancia de difusión de oxígeno.

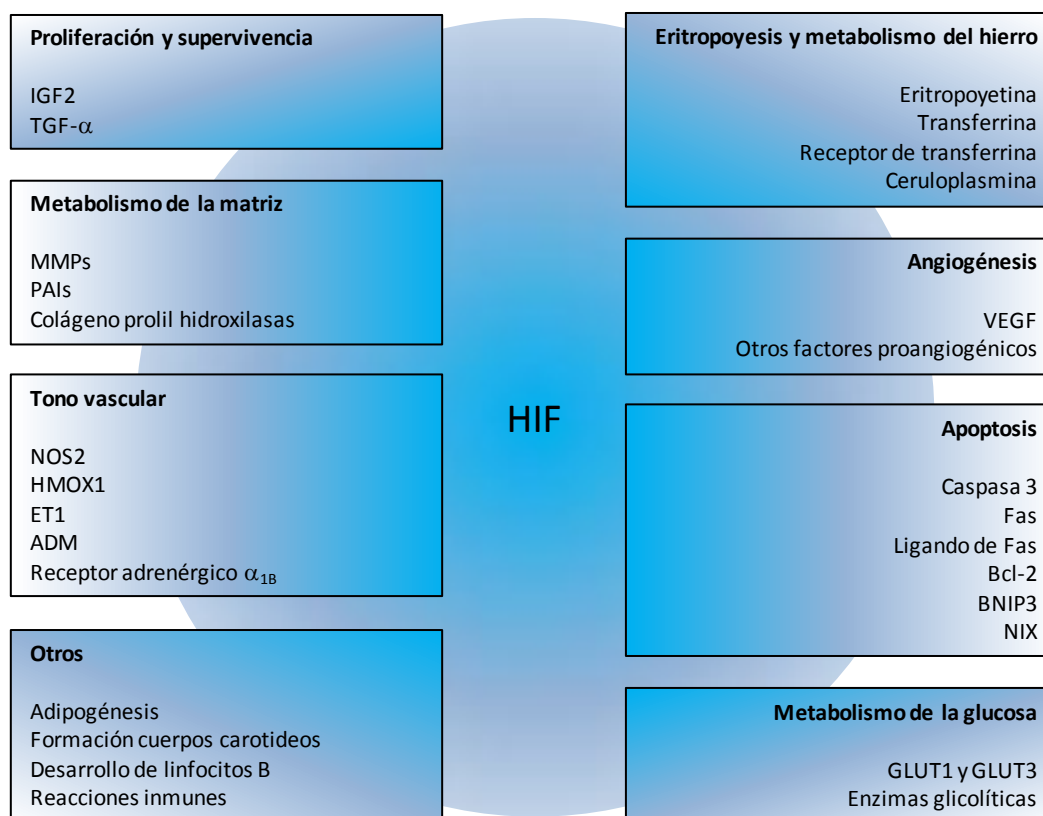
- **Tono vascular y metabolismo de la matriz:** HIF-1 también regula genes involucrados en el control del tono vascular como son la sintasa de óxido nítrico (NOS2) (Melillo et al, 1995), hemo oxigenasa 1 (HMOX1) (Lee et al, 1997), endotelina 1 (ET1) (Hu et al, 1998), adrenomedulina (ADM) (Nguyen & Claycomb, 1999), y el receptor adrenérgico  $\alpha_{1B}$  (Eckhart et al, 1997). Además, la hipoxia igualmente induce genes involucrados en el metabolismo de la matriz y maduración de vasos tales como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) (Ben-Yosef et al, 2002), el receptor de plasminógeno activador inhibitor (PAIs) (Kietzmann et al, 1999) y la colágeno prolil hidroxilasa (Takahashi et al, 2000).

- **Metabolismo de la glucosa:** En condiciones de bajo suministro de oxígeno, las células cambian su ruta de metabolismo de la glucosa desde el ciclo de ácidos tricarbóxicos (TCA) que es dependiente de oxígeno, a la glicolisis que es independiente de oxígeno (Dang & Semenza, 1999; Seagroves et al, 2001). Con sólo 2 moléculas de ATP producidas en la glicolisis, en lugar de 38 producidas en el TCA, las células hipóxicas elevan su capacidad de producir ATP por el incremento de la captación de glucosa. Esto se consigue por la sobre-expresión de enzimas glicolíticas y transportadores de glucosa (Wenger, 2002). La hipoxia a través de HIF-1 incrementa prácticamente todas las enzimas de la ruta glicolítica, así como los transportadores de glucosa 1 y 3 (GLUT1, GLUT3) (Chen et al, 2001). Además, los productos metabólicos de la glicolisis, tales como el lactato y el piruvato, han sido descritos como causantes de la acumulación de HIF-1 $\alpha$  en normoxia, y regulan la expresión de genes inducibles por hipoxia, estableciéndose un ciclo de retroalimentación positiva (Lu et al, 2002).

- **Proliferación celular y supervivencia:** La hipoxia y HIF-1 inducen factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF2) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) (Feldser et al, 1999; Krishnamachary et al, 2003). La unión de estos factores a sus respectivos receptores activa rutas de transducción de señales que permiten la proliferación y supervivencia celular y estimula la expresión de HIF-1 $\alpha$  (Semenza, 2003). Las citoquinas y factores de crecimiento, así como la hipoxia en algunos tipos de células, pueden activar las vías de señalización de MAPK y PI3K quinasas, que promueven la proliferación celular y supervivencia, así como contribuir a la actividad de HIF-1. Esto conduce a un aumento de la actividad transcripcional de HIF-1 en los genes diana, incluyendo IGF2 y TGF- $\alpha$ , contribuyendo así a una ruta de señalización autocrina que son cruciales para la progresión del cáncer (Semenza, 2003).

- **Apoptosis:** Paradójicamente, la adaptación celular a la hipoxia conduce no solo a la proliferación y supervivencia sino también a la muerte celular en ciertas circunstancias. La hipoxia se ha visto que induce apoptosis, donde HIF-1 juega un complejo papel (Carmeliet et al, 1998). También se ha demostrado que la expresión de HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  correlaciona con la apoptosis y factores proapoptóticos tales como la caspasa-3, Fas y el ligando de Fas (Volm & Koomägi, 1999). Además, la hipoxia reprime la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Carmeliet et al, 1998), mientras que la proteína proapoptótica BNIP3 y su homólogo NIX son sobreexpresados de manera dependiente de HIF (Bruick, 2000). Algunos genes involucrados en el control del ciclo celular como p53 y p21 han sido también descritos como dependientes de HIF (Carmeliet et al, 1998). En este sentido, p53 está implicada en la regulación de la apoptosis a través de la inducción de genes proapoptóticos como Bax, NOXA, PUMA y PERP (Schuler & Green, 2001).

- **Otros procesos:** Además de los procesos anteriormente descritos, HIF-1 también regula muchos otros genes diana implicados en diversos procesos tales como la adipogénesis (Yun et al, 2002), formación de cuerpos carótidos (Kline et al, 2002), desarrollo de linfocitos B (Kojima et al, 2002) y reacciones inmunes (Hellwig-Bürgel et al, 2005).



**Figura 9. Resumen de algunos de los procesos en los que interviene HIF-1.** HIF-1 interviene en varios procesos, la mayoría de ellos dispuestos a contrarrestar el estado de hipoxia y conseguir volver a un estado normal de  $O_2$ .

## 5.2.- Implicaciones fisiopatológicas de la modulación de HIF-1 $\alpha$ .

La ruta de respuesta a hipoxia se ha relacionado con un amplio número de patologías humanas, entre las que destacan especialmente por su papel relevante la anomalías en el desarrollo embrionario, el cáncer y la enfermedad isquémica.

- **Desarrollo embrionario:** Como ya hemos comentado anteriormente, diferentes componentes del sistema de HIF juegan un papel esencial en el desarrollo embrionario. Los embriones de ratón deficientes en HIF-1 $\alpha$  mueren en el día embrionario 11 por falta de formación de vasos sanguíneos, formación defectuosa del pliegue neural y malformación cardiovascular (Iyer et al, 1998; Ryan et al, 1998). Aunque los ratones heterocigotos que llevan una sola copia del gen HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha^{+/-}$ ) se desarrollan normalmente, muestran peores respuestas fisiológicas cuando se enfrentan a hipoxia crónica (Aimee et al, 1999; Kline et al, 2002). Los embriones de ratón carentes de HIF-2 $\alpha$  mueren entre los días embrionarios 12,5 y 16,5 como resultado de la fusión y remodelado inadecuado de los vasos sanguíneos, deterioro en la maduración pulmonar fetal y una frecuencia cardíaca muy lenta debido a la producción insuficiente de catecolaminas (Peng et al, 2000; Tian et al, 1998). Por lo tanto, parece que HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  tienen funciones no redundantes en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo, a pesar de su gran similitud en cuanto a la secuencia de aminoácidos, disposición de dominios, capacidad de unión a ADN y la activación de hipoxia. Los embriones sin HIF-1 $\beta$

mueren en el día embrionario 10,5 y muestran defectos en la formación de vasos sanguíneos, angiogénesis defectuosa en el saco vitelino y arcos branquiales, desarrollo atrofiado y debilitamiento embrionario (Maltepe et al, 1997).

- **Cáncer:** Una de las implicaciones más importantes de la modulación del factor de transcripción HIF se encuentra en el control de la carcinogénesis. Acompañando al crecimiento de los tumores se produce una necesidad de suministro de oxígeno a las células, la cual se cubre a través de la angiogénesis. Al mismo tiempo, se produce una activación de la glucólisis, también denominado efecto Warburg (Seagroves et al, 2001). En este sentido, se han encontrado en varios tipos de tumores humanos una clara sobre-expresión de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ , provocada como consecuencia de una hipoxia en el interior del tumor (Talks et al, 2000; Zhong et al, 1999). Esta zona que se va haciendo progresivamente hipóxica a medida que la masa tumoral aumenta su tamaño, lo que resulta finalmente en un incremento de la estabilidad y actividad de HIF-1 $\alpha$ .

Además de las alteraciones provocadas por los cambios en la disponibilidad de oxígeno sufridos en la células tumorales, otro tipo de modificaciones importantes de la ruta de HIF se han identificado asociadas a la carcinogénesis. Por ejemplo, la pérdida de la función de VHL en ciertos tipos de tumores, resulta en una expresión constitutiva de HIF-1 $\alpha$  (Iliopoulos et al, 1996). Además, la pérdida de función de p53, la cual está inactiva en la mayoría de cánceres humanos, incrementa los niveles de HIF-1 $\alpha$  y potencia la transcripción dependiente de este factor de transcripción (Ravi et al, 2000). Igualmente, el potencial de transformación del oncogén v-Src se piensa que es debido en parte a su inducción por HIF-1 $\alpha$  (Jiang et al, 1997). Por otra parte, el incremento en la señalización del receptor tirosina quinasa HER2 se ha visto que incrementa la tasa de síntesis de HIF-1 $\alpha$  (Laughner et al, 2001). En resumen, parece que la sobre-expresión de HIF-1 $\alpha$  confiere ventajas selectivas a las células tumorales. En este sentido, una correlación directa entre la expresión de HIF-1 $\alpha$  y la mortalidad del paciente, peor pronóstico o resistencia al tratamiento se ha observado en muchos estudios (Semenza, 2003).

- **Enfermedad isquémica:** La activación de HIF-1 $\alpha$  también ha sido demostrada en un amplio rango de respuestas fisiológicas a la isquemia, hipoxia y condiciones inflamatorias, donde juega un papel positivo en la respuesta a daños en órganos o tejidos. Por ejemplo, los niveles de HIF-1 $\alpha$  y VEGF se presentan incrementados en el miocardio en pacientes con oclusión de arteria coronaria (Lee et al, 2000). La remodelación vascular efectiva después de una lesión isquémica depende igualmente de un programa de expresión génica dependiente de HIF-1 $\alpha$ . El incremento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  y los genes a los que regula ha sido también observada en modelos de rata y oveja de isquemia miocárdica y cerebral (Bergeron et al, 1999; Martín et al, 1998). Además, la inducción de HIF-1 $\alpha$  o HIF-2 $\alpha$  ha sido igualmente observada en la placenta preeclampsia (Rajakumar et al, 2003), en los macrófagos en sinovia reumatoide (Hollander et al, 2001), en la retina isquémica (Grimm et al, 2002; Ozaki et al, 1999), así como en la cicatrización de heridas (Elson et al, 2000).

### 5.3.- Manipulación farmacológica de la ruta de HIF-1 $\alpha$ .

El hecho de que HIF-1 $\alpha$  participe en numerosos procesos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos, ha abierto importantes líneas de investigación con el objetivo de desarrollar tanto inhibidores de la activación aberrante de HIF-1 $\alpha$  (ej. Cáncer y procesos que cursan con angiogénesis), como activadores de HIF-1 $\alpha$ , también llamados hipoximiméticos, para el tratamiento de enfermedades tan diversas como la anemia, el tratamiento de pie diabético y úlceras crónicas, y la enfermedad inflamatoria intestinal entre otras (Rabinowitz, 2013). Prácticamente todos los hipoximiméticos en desarrollo están basados en la inhibición farmacológica o génica de la PHD2 (Rabinowitz, 2013). La activación de HIF-1 puede tener también un papel muy importante en enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas a través de la inducción de lo que se conoce como preconditionamiento hipóxico (PH) (Stetler et al, 2014).

La observación de que el PH protege el cerebro contra una posterior anoxia fue descubierto hace más de 20 años. Subsecuentemente los efectos del PH han sido estudiados en tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes modelos de hipoxia, aunque los mecanismos moleculares y celulares han sido ampliamente estudiados y aún no se conocen en detalle varias hipótesis han sido postuladas. Por ejemplo la PH activa una gran variedad de mediadores endógenos neuroprotectores o inhibe la producción de otros mediadores nocivos para el cerebro. La combinación de ambos efectos atenúan la producción de radicales libres y favorecen la supervivencia celular en condiciones de hipoxia severa (Stetler et al, 2014).

Debido al elevado consumo intrínseco de oxígeno, el SNC es extremadamente sensible a la hipoxia y además su capacidad de regeneración y reparación es sensiblemente menor al de otros órganos periféricos. Por tanto, la prevención es especialmente importante en enfermedades del SNC tales como el infarto y la parálisis cerebral. En la actualidad no existen fármacos efectivos que puedan proteger al cerebro de estas situaciones patológicas, y por tanto, conocer los mecanismos neuroprotectores que se activan en el PH contribuirá al desarrollo de nuevas terapias contra enfermedades hipóxicas del SNC (Harten et al, 2010).

## *OBJETIVOS*

---



#### IV.- OBJETIVOS.

Numerosas evidencias sugieren que un aumento del tono endocannabinoide puede ejercer efectos beneficiosos en enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas. Es posible que el NADA y otras *N*-acil dopaminas puedan ejercer un efecto neuroprotector a través de la activación de HIF-1 $\alpha$ , el cual regula numerosos procesos a nivel del SNC incluyendo la neurogénesis y el preconditionamiento hipóxico. Aunque el metabolismo del NADA y de las *N*-acil dopaminas aún no ha sido identificado con detalle, si se sabe que la síntesis del NADA está regulada por la FAAH, y es más que probable que su catabolismo e inactivación se produzca por la catecol-O-metil transferasa (COMT) o por aril-sulfotransferasas (AST). Por tanto es factible que inhibidores del catabolismo del NADA puedan incrementar sus niveles en el cerebro y así favorecer su actividad neuroprotectora. Por todo esto, los objetivos del presente trabajo han sido:

- 1. Estudiar los mecanismos bioquímicos y moleculares por los que el NADA y otras *N*-acil dopaminas estabilizan HIF-1 $\alpha$  en células primarias del SNC y en líneas celulares derivadas del SNC.**
- 2. Estudiar los mecanismos moleculares por los que el NADA desestabiliza SIAH2 y sus consecuencias biológicas.**
- 3. Estudiar los efectos del NADA *in vivo*.**





## *MATERIALES Y MÉTODOS*

---



## V.- MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1.- Líneas celulares.

Las líneas celulares HEK-293T, HeLa, SK-N-SH, U87, MO3.13 y MEF (mouse embryonic fibroblasts) Siah1a<sup>-/-</sup> y Siah2<sup>-/-</sup>, fueron mantenidas en crecimiento exponencial en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% penicilina/estreptomicina. Todas las líneas fueron crecidas a 37 °C en un ambiente humidificado conteniendo un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) fueron mantenidas en medio 199 suplementado con 20% FBS, 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES, 30 µg/ml ECGS (endothelial cell growth supplement) y 100 µg/ml de heparina. Las células primarias fueron suministradas por ScienCell (Carlsbad, CA, USA). Las células HBMEC (human brain microvascular endothelial cells) fueron mantenidas en medio para células endoteliales (ScienCell, P60104) suplementado con 5% FBS, 1% ECGS y 1% penicilina/estreptomicina. Los astrocitos humanos fueron mantenidos en medio de astrocitos (ScienCell, P60101) suplementado con 2% FBS, 1% AGS (astrocyte growth supplement) y 1% penicilina/estreptomicina. Neuronas humanas de córtex fueron mantenidas en medio neuronal (ScienCell, P60157) suplementado con 1% NGS (neural growth supplement) y 1% penicilina/estreptomicina. La hipoxia fue inducida mediante el cultivo de las células en un incubador New Brunswick Galaxy 48R a una concentración de 1% de O<sub>2</sub>.

### 2.- Transfección y plásmidos.

Las transfecciones transitorias fueron llevadas a cabo con Roti-Fect (Carl Roth) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron recogidas entre 36 y 48 horas después de la transfección. Las cantidades de ADN se mantuvieron constantes en cada transfección mediante la adición de los correspondientes vectores de expresión vacíos. Los plásmidos Flag-SIAH2, HA-SIAH2, Flag-SIAH2 RM (Ring Mutant, H98A/C101A), HA-SIAH2 RM, Flag-SIAH2-5A (Ser16, Thr26, Ser28, Ser68 y Thr119 convertidos en alanina), Flag-SIAH2-5D (Ser16, Thr26, Ser28, Ser68 y Thr119 convertidos en ácido aspártico), HA-ubiquitina, HA-HIPK2 y Flag-DYRK2 han sido previamente descritos (Calzado et al, 2009; Gwack et al, 2006; Pérez et al, 2012). El plásmido Flag-PHD3 fue cedido amablemente por el Dr. Frank S. Lee (Pennsylvania School of Medicine) y el plásmido EPO-Luc fue cedido por el Dr. M. L. Schmitz (Universidad de Giessen, Alemania).

### 3.- Reactivos.

*N*-araquidonoil dopamina (NADA), *N*-oleil dopamina (OLDA), dopamina, cicloheximida, DCNP y Tolcapona fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). *N*-palmitoil dopamina (PALDA) y AM251 fueron suministrados por Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). *N*-estearoil dopamina (STEARDA) fue suministrado por Tocris Bioscience (Bristol, UK). *N*-araquidonoil-L-tirosina, *N*-araquidonoil etanolamina (AEA), *N*-(4-hidroxifenil)-araquidonoil

etanolamina (AM404), LY294002 y MG-132 fueron suministrados por Enzo Life Science (Lausen, Suiza). SB705498 fue adquirido de Selleck Chemicals LCC (Houston, TX, USA). Los compuestos ésteres de hidroxitirosol fueron cedidos por el Prof. Giovanni Appendino (UNIPMN, Novara, Italia). Los oligonucleótidos silenciadores de ARN control (D-001810-10-20) y el siGENOME SMARTpool frente a SIAH2 (M-006561-02) fueron suministrados por Dharmacon (Waltham, MA, USA). Otros reactivos generales no descritos en detalles fueron comprados a Sigma-Aldrich.

#### **4.- Western blot y anticuerpos.**

Las células fueron lavadas dos veces en PBS (tampón salino-fosfato). Las fracciones solubles celulares fueron obtenidas mediante el lisado de las células en 100  $\mu$ l de tampón NP-40 (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol y 1% NP-40) suplementado con 10 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mg/ml leupeptina, 1 mg/ml pepstatina y aprotinina y 2 mM de PMSF. Tras centrifugar el lisado durante 15 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante fue mezclado con tampón de carga SDS 1x (dodecil sulfato de sodio) y hervido a 95  $^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos. A continuación, las proteínas fueron sometidas a electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida 8-10% (SDS-PAGE). A continuación, las proteínas incluidas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) durante 30 minutos a 20 voltios. Las membranas fueron incubadas en un tampón TTBS (tampón tris salino con Tween-20 0,1 %) conteniendo leche desnatada o BSA (seroalbúmina bovina) disuelta al 5%. Tras el bloqueo de sitios de unión inespecíficos las membranas se lavaron 3 veces en TTBS y se incubaron con los respectivos anticuerpos. El anticuerpo primario se diluyó en la misma solución de bloqueo y se dejó incubar toda la noche a 4  $^{\circ}\text{C}$  y agitación. Tras este tiempo las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TTBS y se añadió el anticuerpo secundario también disuelto en solución de bloqueo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos secundarios llevan acoplados la peroxidasa para poder ser detectados mediante un sistema de quimioluminiscencia. Tras el tiempo de incubación, las membranas se volvieron a lavar y se produjo el revelado de las mismas con el ya mencionado sistema de detección de quimioluminiscencia.

Los anticuerpos frente al epítipo Flag (clon M2) y anti  $\beta$ -actina (AC-74) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los anticuerpos anti-SIAH2 (sc-5507) y anti-DYRK2 (sc-66867) fueron obtenidos de Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo anti-HIPK2 fue cedido por el Dr. M. L. Schmitz y ha sido descrito previamente (de la Vega et al, 2013). El anticuerpo anti epítipo HA (clon 3F10) fue adquirido a Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania). El anticuerpo anti-HIF-1 $\alpha$  (610959) fue comprado a BD Biosciences (Madrid, España), el anti-PHD3 (ab30782) y el anti-PHD2 (ab109088) fueron de Abcam (Cambridge, UK) y el anti-fosfo-Akt Ser472 (9271) fue de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA).

### **5.- Ensayo de inmunoprecipitación.**

Las células fueron recogidas y lavadas dos veces con PBS mediante centrifugación. Posteriormente se lisaron en tampón de inmunoprecipitación (IP) (50 mM Hepes pH 7,5, 50 mM NaCl y 1% Tritón X-100) suplementado con 5 mM EGTA, 20 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 50 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 2 mM PMSF y 1 mg/ml de leupeptina, aprotinina y pepstatina. El lisado fue llevado a un volumen final de 1 ml e incubado con 1  $\mu\text{g}$  de anticuerpo durante 7-8 horas a 4 °C en rotación. Tras este tiempo, se añadieron 30  $\mu\text{l}$  de bolas proteína A/G PLUS-Agarosa y se dejó incubar toda la noche a 4 °C y en rotación. Después de la incubación, las muestras fueron lavadas 5 veces con el tampón IP y posteriormente se eluyeron en SDS 2x para finalmente realizar un western blot.

### **6.- Ensayo de luciferasa.**

Las células fueron recogidas y lavadas en PBS mediante centrifugación. La lisis se produjo en tampón de luciferasa (25 mM Tris-fosfato pH 7,8, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 1% Tritón X-100 y 7% de glicerol) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La actividad luciferasa en el extracto fue determinada siguiendo las instrucciones del sistema Luciferase assay de Promega (Madison, WI, USA) y mediante el uso del luminómetro Autolumat LB953 (EG&G Berthold, USA). Los niveles de transactivación fueron expresados como porcentaje de inducción.

### **7.- Tratamiento con Tolcapona y 2,6-dichloro-4-nitrophenol (DCNP).**

Ante la imposibilidad de suministrar NADA en el cerebro de ratones de forma diseminada, se ha diseñado un experimento con el que se pretendió incrementar la concentración del NADA endógeno a través de la inhibición de su degradación mediante los compuestos Tolcapona (inhibidor de la COMT) y DCNP (inhibidor de arilsulfonil-transferasas). El diseño experimental ha consistido en cuatro grupos de seis ratones cada uno. Los grupos establecidos fueron grupo control, DCNP, tolcapona y DCNP/tolcapona. El tratamiento de los ratones consistió en la administración intraperitoneal de los compuestos dos veces con un intervalo de 16 horas y el sacrificio se produjo 24 horas después de la primera administración. El cerebro fue almacenado en RNA later y guardado hasta su posterior utilización. Los compuestos fueron disueltos en una solución de PBS con un 5% de BSA y 0,2% de DMSO y las dosis suministradas fueron de 5 mg/kg en el caso de DCNP y de 30 mg/kg en el caso de la tolcapona.

### **8.- Extracción de ARN y qRT-PCR.**

Las células fueron recogidas y lavadas en PBS dos veces. La extracción de ARN total fue realizada usando el High Pure RNA Isolation Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción de ARNm a ADNc se realizó con iScript cDNA Synthesis Kit

(Bio-Rad, Madrid, España) siguiendo el protocolo del fabricante. La amplificación de los productos retrotranscritos fue realizada mediante el kit iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en un sistema de detección iCYCLER (Bio-Rad). El programa de amplificación está compuesto por una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C seguida de 40 ciclos con una desnaturalización de 30 segundos a 95 °C, un anillamiento de 30 segundos a 57 °C y una elongación final de 45 segundos a 72 °C. La eficiencia de amplificación fue validada y normalizada frente a la expresión del gen  $\beta$ -actina. El cambio de expresión fue calculado usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Schmittgen & Livak, 2008). Los cebadores usados se muestran en la tabla 2.

Gen	Cebador (5' - 3')
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	Fw: 5'-GAAAGCGCAAGTCTTCAAAG-3' Rv: 5'-TGGGTAGGAGATGGAGATGC-3'
<i>SIAH2</i>	Fw: 5'-CTATGGAGAAGGTGGCCTCG-3' Rv: 5'-CGTATGGTGCAGGGTCAGG-3'
<i>HK2</i>	Fw: 5'-CAAAGTGACAGTGGGTGTGG-3' Rv: 5'-GCCAGGTCCTTCACTGTCTC-3'
<i>BNIP3</i>	Fw: 5'-GCTCCCAGACACCACAAGAT-3' Rv: 5'-TGAGAGTAGCTGTGCGCTTC-3'
<i>HMOX1</i>	Fw: 5'-AAGATTGCCAGAAAGCCCTGGAC-3' Rv: 5'-AACTGTCGCCACCAGAAAGCTGAG-3'
<i>VEGF</i>	Fw: 5'-AGGAGGAGGGCAGAATCATCA-3' Rv: 5'-CTCGATTGGATGGCAGTAGCT-3'
$\beta$ -actina	Fw: 5'-GCTCCTCCTGAGCGCAAG-3' Rv: 5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'

**Tabla 2. Cebadores usados para PCR cuantitativa en células humanas.**

La extracción de ARN de cerebro de ratón se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit RNAeasy Lipid Tissue mini Kit (Qiagen). La posterior retrotranscripción fue realizada al igual que en el caso anterior con iScript cDNA Synthesis Kit y la reacción de PCR cuantitativa con el kit iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). En este caso se analizaron los genes *Hmox*, *Vegfa*, *Angptl4*, *Bnip3*, *Slc2a1* y *Ca-9* utilizando *Gapdh* como gen normalizador. Los cebadores se muestran en la tabla 3.

Gen	Cebador (5' - 3')
<i>Hmox</i>	Fw: 5'-CACTTCGTCAGAGGCCTGCTA-3' Rv: 5'-GTCTGGGATGAGCTAGTGCTGAT-3'
<i>Vegfa</i>	Fw: 5'-CATCTTCAAGCCGTCCTGTGT-3' Rv: 5'-CAGGGCTTCATCGTTACAGCA-3'
<i>Angptl4</i>	Fw: 5'-GGACTGGGATGGCAATGC-3' Rv: 5'-CCTCACCCCAAATGG-3'
<i>Bnip3</i>	Fw: 5'-ACTCAGATTGGATATGGGATTGG-3' Rv: 5'-GAGACAGTAACAGAGATGGAAGG-3'
<i>Slc2a1</i>	Fw: 5'-ACTGGGCAAGTCCTTTGAGA-3' Rv: 5'-GTCTAAGCCAAACACCTGGGC-3'

<i>Ca-9</i>	Fw: 5'-CTGAAGACAGGATGGAGAAG-3' Rv: 5'-GCAGAGTGCGGCAGAATG-3'
<i>Gapdh</i>	Fw: 5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3' Rv: 5'-AAGATGGTGTATGGGCTTCCCG-3'

**Tabla 3. Cebadores usados para PCR cuantitativa en cerebro de ratón.**

### 9.- PCR Array.

Para realizar el array de expresión génica para cada situación de estudio, se tomó 1  $\mu\text{g}$  de ARN y se retrotranscribió a ADNc usando el RT<sub>2</sub> First Strand Synthesis Kit (SABiosciences, Frederick, MD, USA). El ADNc se utilizó para realizar el array "human hypoxia signaling pathway" (SABiosciences, PAHS-032) usando el RT2 SYBR green qPCR master mix (SABioscience, 330510) para producir la reacción de amplificación. Cada array está compuesto por 84 genes que están involucrados en la señalización relacionada con la hipoxia, además de incluir 12 secuencias que actúan como control de carga y como medidores de la calidad del ADNc. El incremento del cambio en la expresión fue calculado, al igual que las qPCR, usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . En esta ocasión, se utilizaron cinco genes normalizadores siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante.

### 10.- Ensayo de angiogénesis.

Las células HUVEC y HBMEC se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^4$  en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  sobre una capa uniforme de 50  $\mu\text{l}$  de matriz Matrigel (BD Biosciences) en placas negras de 96 pocillos especiales para su posterior consecución de imágenes. El estímulo se añadió en el mismo momento en el que las células fueron sembradas. Después de 6 horas ya es detectable la formación tubular y en ese momento se lavaron las células dos veces con PBS para posteriormente tñirlas con una solución 5  $\mu\text{M}$  de Calcein-AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en PBS. Las imágenes de la formación tubular fueron tomadas usando el microscopio BD Pathway 855 Bioimager con el objetivo 4x y realizando un montaje 3x3 para poder cubrir todo el pocillo. El posterior análisis de la imagen se hizo mediante el software BD Attovision v1.7 con el cual se cuantificó la longitud total de los túbulos y el número de ramificaciones de los túbulos.

### 11.- Ensayo de viabilidad celular.

Células SK-N-SH fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de  $7 \times 10^3$  células por pocillo. Después de 24 horas, las células se pretrataron (o no) con NADA 10  $\mu\text{M}$  durante 3 horas y luego fueron sometidas (o no) a hipoxia 1% O<sub>2</sub> durante 3 horas. La viabilidad celular se midió con el reactivo MTT (5 mg/ml, Sigma-Aldrich). Este fue añadido tras las 6 horas de estímulos y se incubó durante 3 horas a 37 °C en oscuridad. Los cristales de formazán formados se solubilizaron mediante la adición de 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. La medida colorimétrica se consiguió midiendo la absorbancia a 550 nm usando un lector de placas (TECAN GENios Pro, Suiza).



## 12. Péptido-quinasa-array.

La matriz de péptidos utilizada ha sido validada en anteriores estudios y sus características se describen en la página web del fabricante Pepscan Presto (Lelystad, Países Bajos). Esta matriz contiene 1.024 péptidos (48 controles, 976 experimentales) que representan proteínas de señalización cuyos fosfo-péptidos se han identificado experimentalmente y están incluidos en la base de datos PhosphoELM. La matriz de péptidos fueron incubadas con extractos celulares de células tratadas o no con NADA, preparados en un buffer de reacción conteniendo 60 mM HEPES pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 10 mM, 0,05% de BSA, 5,3% de glicerol y 267 µCi/ml [<sup>32</sup>P-γ]-ATP en un volumen final por array de 80 µl. La incubación se realizó durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente se lavaron con PBS conteniendo 0,1% de Tritón X-100, seguido de NaCl 2M y finalmente H<sub>2</sub>O desmineralizada y secado bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La señal radioactiva se detectó utilizando un Phosphor-Imager (Storm, Amersham Biosciences) y se cuantificaron mediante el uso de un software de cuantificación estándar (Quantity One, BioRad) y el programa ScanAlyze (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). Basado en esta información, se generó un listado con las quinasas responsables de la fosforilación de los péptidos que mostraron una expresión diferencial en presencia de NADA, la cual se muestra en la sección de resultados.

## 13.- Análisis estadístico.

Los datos son expresados con la media y desviación estándar de un mínimo de 3 experimentos. Las diferencias fueron analizadas mediante el test t-Student tomando como factor de significación P < 0,05. Las imágenes y analizadas y cuantificadas usando el software ImageJ v1.45 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software GraphPad Prism v6.00 (GraphPad, San Diego, CA, USA)

## *RESULTADOS*

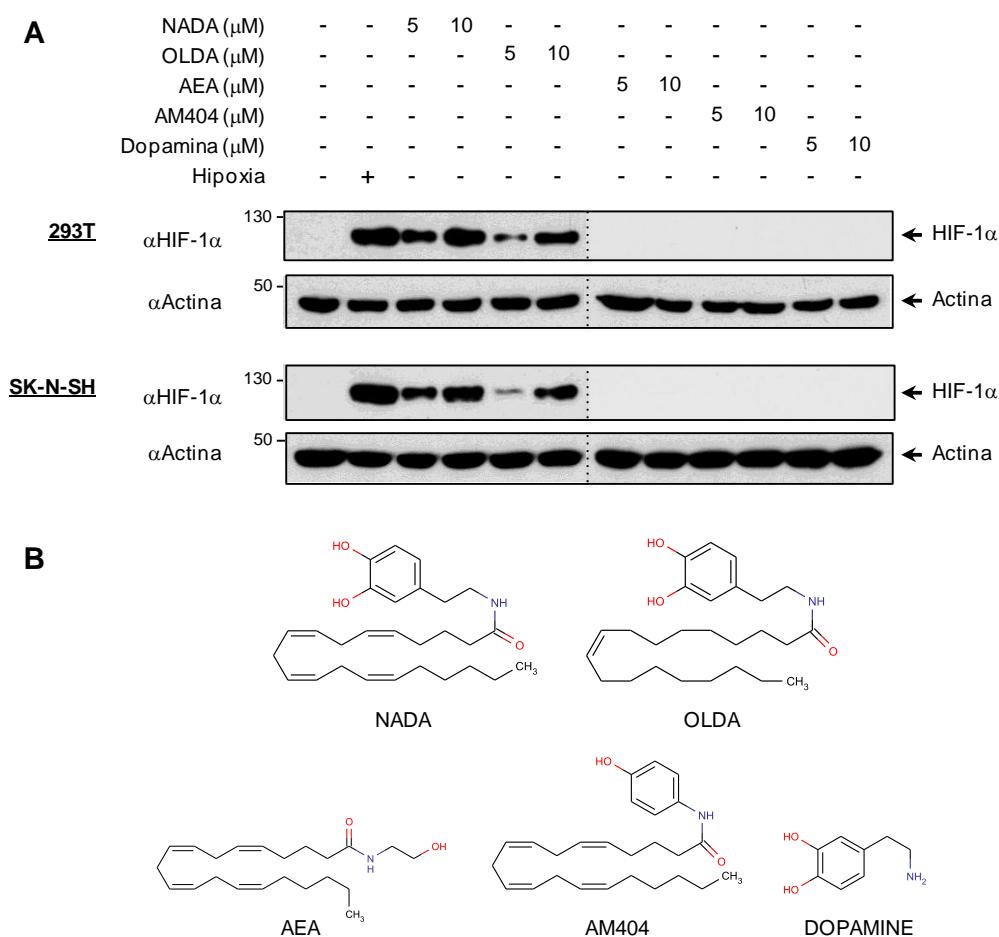
---



## VI.- RESULTADOS.

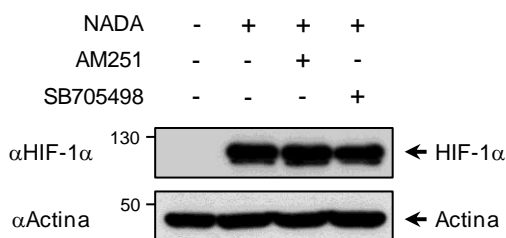
1.- Las *N*-acil dopaminas median la estabilización de HIF-1 $\alpha$  a través de mecanismos independientes de CB $_1$  y TRPV1.

En primer lugar, y para investigar el posible efecto de diferentes *N*-acil dopaminas y de algunos compuestos relacionados sobre la ruta de respuesta a hipoxia, decidimos analizar los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  en líneas celulares neuronales y no neuronales. Como se observa en la figura 10, tanto en el caso de NADA como OLDA indujeron la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  en las líneas celulares HEK-293T y SK-N-SH, alcanzando niveles similares a los obtenidos en las mismas células tras ser expuestas a bajos niveles de oxígeno (1% O $_2$ ). Por el contrario, ni la AEA ni la dopamina fueron capaces de inducir la expresión de HIF-1 $\alpha$  en estas mismas líneas celulares. Igualmente, incluimos en este primer análisis el compuesto AM404, una molécula híbrida con actividad agonista para CB $_1$  y TRPV1, el cual tampoco logró aumentar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ .



**Figura 10. Efecto de *N*-acil dopaminas y compuestos relacionados sobre la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$ .** (A) Células HEK-293T y SK-N-SH fueron incubadas con los compuestos a las dosis indicadas durante 6 horas. La hipoxia fue inducida mediante la incubación de las células a una concentración de O $_2$  del 1% durante 6 horas. Finalmente, la expresión de HIF-1 $\alpha$  se determinó mediante western blot utilizando anticuerpos anti HIF-1 $\alpha$  y anti- $\beta$ -actina como control de carga. (B) Estructuras químicas de los diferentes compuestos.

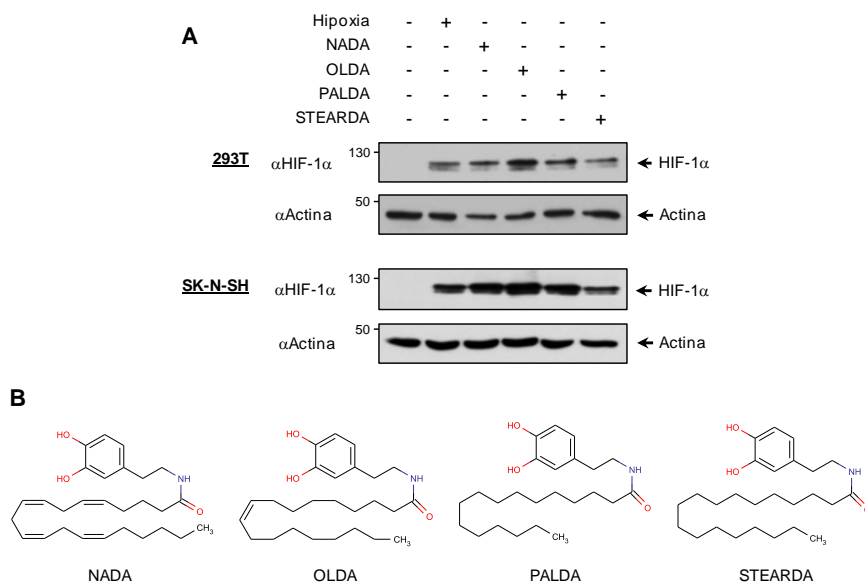
A continuación, y para analizar el posible papel de los receptores CB<sub>1</sub> y TRPV1 en la estabilización de HIF-1 $\alpha$  mediada por NADA en la línea celular SK-N-SH, decidimos usar antagonistas específicos para cada uno de ellos; AM251 como antagonista de CB<sub>1</sub> y SB705498 como antagonista de TRPV1. Como se observa en la figura 11, ninguno de los dos antagonistas fue capaz de inhibir el efecto inductor del NADA sobre HIF-1 $\alpha$ .



**Figura 11. Efecto de los antagonistas de CB<sub>1</sub> y TRPV1 sobre la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en respuesta a NADA.** Células SK-N-SH fueron pre-incubadas con una concentración 1  $\mu$ M de AM251 o SB705498 durante 30 minutos previos al estímulo con NADA (10  $\mu$ M) durante 6 horas. La expresión de HIF-1 $\alpha$  se determinó por western blot utilizando anticuerpos anti-HIF-1 $\alpha$  y anti- $\beta$ -actina.

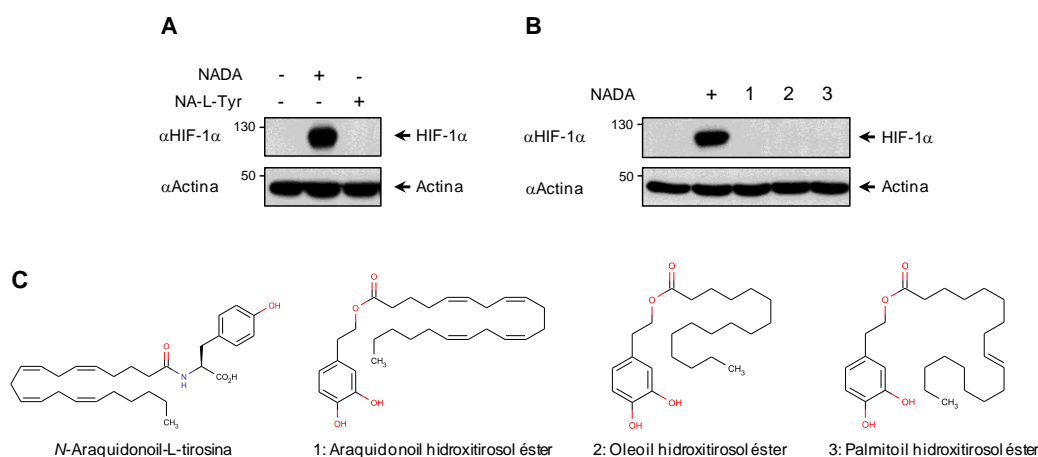
## 2.- Análisis estructura-actividad de las *N*-acil dopaminas sobre la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .

Tal y como se ha comentado en la introducción, las *N*-acil dopaminas son conjugados de ácidos grasos y dopamina unidos mediante un enlace amida. A la luz de los resultados previos, decidimos estudiar en detalle el papel del grupo dopamina sobre la inducción de HIF-1 $\alpha$ . Para ello, en primer lugar células HEK-293T y SK-N-SH fueron estimuladas con las cuatro *N*-acil dopaminas que se han descrito hasta la actualidad (Chu et al, 2003; Huang et al, 2002b), denominadas NADA, OLDA, PALDA y STEARDA. Tal y como se muestra en la figura 12, todas estas moléculas fueron capaces de inducir la estabilización de HIF-1 $\alpha$  a niveles similares o superiores a los obtenidos en respuesta al estímulo con hipoxia.



**Figura 12. Efecto sobre la inducción de HIF-1 $\alpha$  de *N*-acil dopaminas.** (A) Tanto las células HEK-293T como las SK-N-SH fueron tratadas con los compuestos indicados a una concentración de 10  $\mu$ M durante 6 horas. La hipoxia fue inducida como se describió anteriormente. Los resultados de expresión de HIF-1 $\alpha$  fueron determinados mediante western blot utilizando los anticuerpos indicados. (B) Estructuras químicas de las diferentes *N*-acil dopaminas.

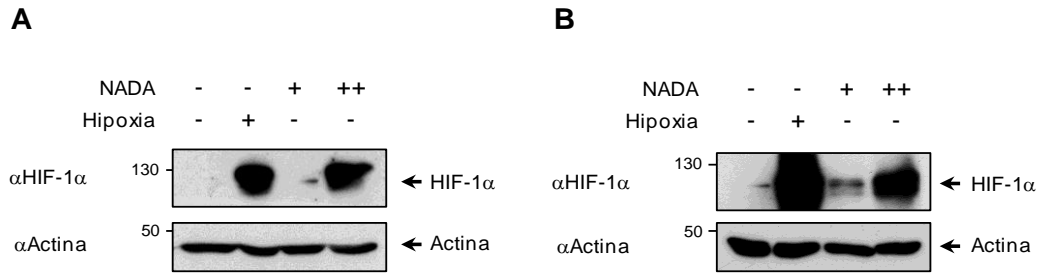
A continuación, evaluamos igualmente un endolípido endógeno relacionado con las *N*-acil dopaminas como es la *N*-araquidonoil-L-tirosina (Figura 13A), junto con otros compuestos sintéticos análogos basados en el grupo hidroxitirosol, un metabolito de la dopamina, tales como el éster araquidonoil hidroxitirosol, éster oleil hidroxitirosol y éster palmitoil hidroxitirosol (Figura 13B). Como se puede observar en los resultados mostrados en la figura 13, ninguno de los compuestos fueron capaces de inducir HIF-1 $\alpha$  en células SK-N-SH. Todos estos datos en su conjunto, y tras analizar en detalle la relación estructura-actividad, indican que los grupos hidroxilos presentes en la mitad fenólica son críticos para la actividad hipóxico-mimética de las *N*-acil dopaminas.



**Figura 13. Los grupos hidroxilo de la dopamina son críticos para la actividad hipóxico-mimética de las *N*-acil dopaminas.** (A y B). Células SK-N-SH fueron tratadas con los compuestos indicados a una concentración de 10  $\mu$ M durante 6 horas y la expresión de HIF-1 $\alpha$  fue analizada mediante western blot utilizando los anticuerpos indicados.

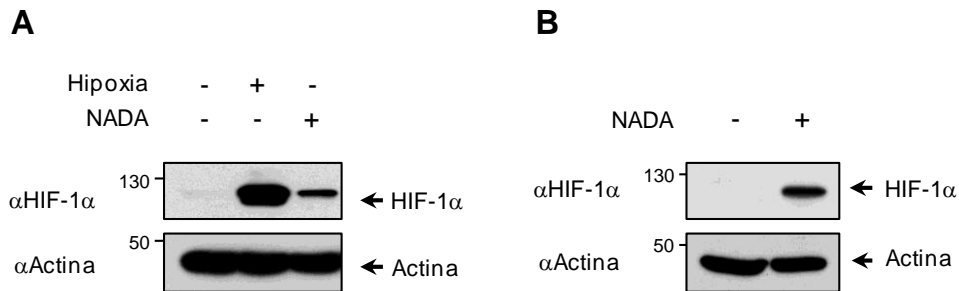
### 3.- NADA estabiliza HIF-1 $\alpha$ en diferentes tipos celulares de origen neuronal.

Para analizar en detalle si la capacidad de las *N*-acil dopaminas de regular la expresión de HIF-1 $\alpha$  está presente en diferentes células con origen neuronal, estudiamos a continuación su efecto en la línea oligodendroglial MO3.13 y en la línea de glioblastoma U87 (Figura 14). De nuevo, las células fueron sometidas a hipoxia (1% O<sub>2</sub>) o estimuladas con NADA, y los niveles de HIF-1 $\alpha$  se analizaron mediante western blot. Tal y como se aprecia en la figura, NADA consiguió inducir la expresión de HIF-1 $\alpha$  a niveles similares a los obtenidos en la respuesta a hipoxia en ambas líneas celulares.



**Figura 14. NADA estabiliza a HIF-1 $\alpha$  en diferentes células de origen neuronal.** Células MO3.13 (A) y U87 (B) fueron sujetas a hipoxia o estimuladas con NADA a dosis crecientes (1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) durante 6 horas y la expresión de HIF-1 $\alpha$  se detectó mediante western blot.

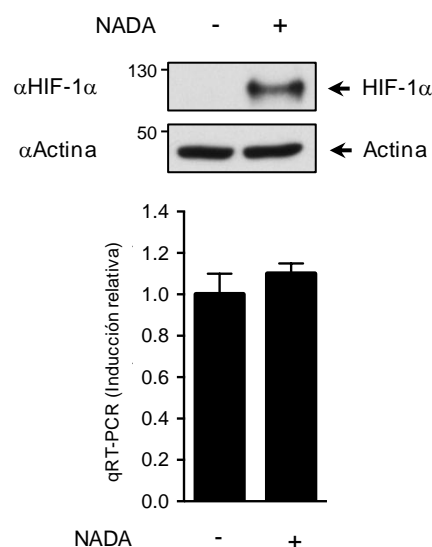
A la vista de estos resultados decidimos ampliar el estudio del efecto de NADA a células primarias de origen cerebral, utilizando en este caso astrocitos y neuronas primarias humanas (Figura 15). De nuevo, NADA produjo una clara inducción de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en ambos tipos celulares. Como se observa en la figura 15 A, en el caso de los astrocitos los niveles obtenidos en respuesta a NADA fueron menores a los obtenidos tras el estímulo con hipoxia. Las diferencias observadas en la respuesta de HIF-1 $\alpha$  a NADA en las distintas líneas y tipos celulares parece reflejar la posible diferencia de expresión de las dianas específicas de NADA, responsables de producir en último término la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .



**Figura 15. NADA estabiliza a HIF-1 $\alpha$  en diferentes células cerebrales.** (A) Astrocitos primarios humanos fueron sujetos a hipoxia o estimulados con NADA (10  $\mu$ M) durante 6 horas. La expresión de HIF-1 $\alpha$  fue analizada por western blot usando los anticuerpos indicados. (B) Neuronas primarias humanas fueron incubadas con NADA (10  $\mu$ M) durante 6 horas y la expresión de HIF-1 $\alpha$  fue estudiada mediante western blot.

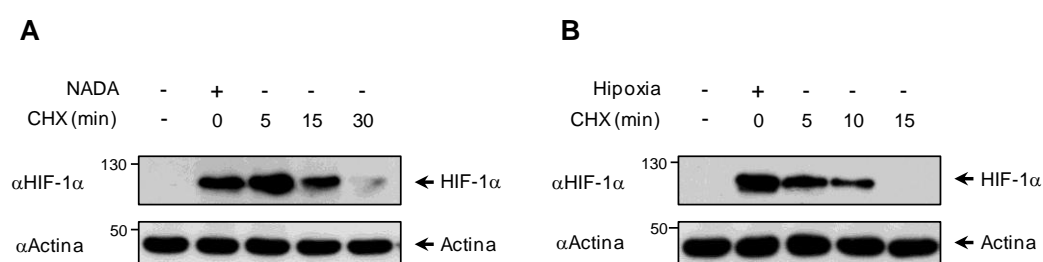
#### 4.- NADA afecta a la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .

En un primer acercamiento para intentar aclarar el mecanismo responsable de la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , decidimos analizar el efecto del NADA sobre su expresión tanto a nivel de ARNm como de proteína. Como mostramos en la figura 16, la estimulación de células SK-N-SH con NADA incrementó significativamente la expresión de HIF-1 $\alpha$  a nivel de proteína. Sin embargo, el análisis en paralelo de los niveles de ARNm mediante qPCR no mostró cambios significativos en la expresión de este factor.



**Figura 16. NADA no afecta a la expresión transcripcional de HIF-1 $\alpha$ .** Células SK-N-SH fueron estimuladas con NADA (10  $\mu$ M) durante 6 horas, lisadas y la expresión de HIF-1 $\alpha$  a nivel de proteína analizada mediante western blot (panel superior) y de ARNm mediante qPCR (panel inferior). Los datos muestran la media junta a la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Ya que estos resultados parecen indicar que NADA afecta a HIF-1 $\alpha$  a nivel de proteína, decidimos monitorizar la vida media de esta proteína después de un tratamiento previo con NADA o hipoxia en presencia de cicloheximida (CHX). Tal y como se puede observar en la figura 17, la vida media de HIF-1 $\alpha$  se vio incrementada tras el tratamiento con NADA, comparado con el estímulo de hipoxia, pasando de 7,9 a 22,1 minutos. Todos estos resultados en su conjunto indican claramente que NADA afecta directamente a la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .



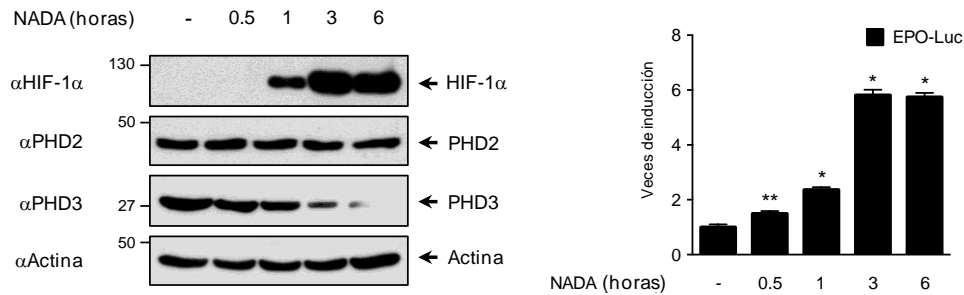
**Figura 17. NADA incrementa la vida media de HIF-1 $\alpha$ .** Células SK-N-SH fueron sometidas a tratamiento con NADA 10  $\mu$ M (A) o hipoxia (B) durante 6 horas. Posteriormente, tras lavar las células, estas fueron tratadas con CHX 40 mg/ml durante los tiempos indicados. Finalmente, la expresión de HIF-1 $\alpha$  fue analizada mediante western blot.

## 5.- NADA induce la degradación de PHD3 sin afectar a la expresión de PHD2.

Continuando con el estudio de la ruta de regulación de HIF-1 $\alpha$  en respuesta al estímulo con *N*-acil dopaminas, las células SK-N-SH fueron transfectadas con un plásmido reportero dependiente de HIF-1 $\alpha$  (EPO-Luc) y estimuladas con NADA. El plásmido EPO-Luc contiene los elementos de respuesta a hipoxia del gen de la eritropoyetina. En paralelo analizamos la



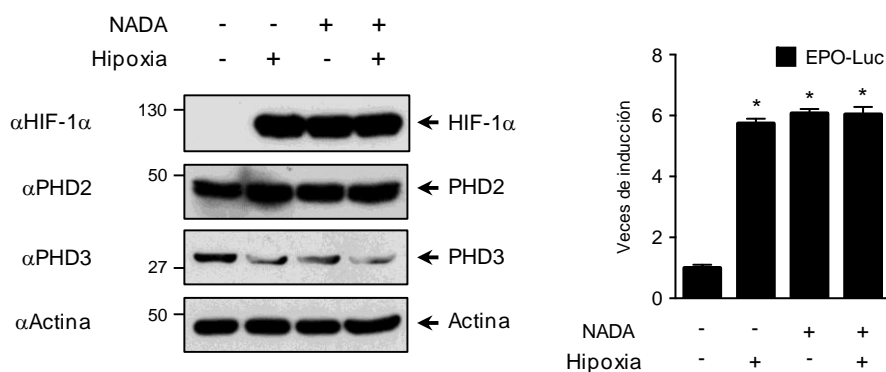
expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$ , PHD2 y PHD3, así como la actividad de HIF-1 $\alpha$ . Tal y como se muestra en la figura 18, el tratamiento con NADA provocó un claro incremento de HIF-1 $\alpha$  tras una hora de estímulo, mostrando un pico máximo a las 3 horas y comenzando a decrecer a las 6 horas. La estabilización de HIF-1 $\alpha$  fue acompañada de una disminución gradual de los niveles de PHD3, no viéndose afectados los niveles de PHD2. En paralelo, el efecto de la estabilización de HIF-1 $\alpha$  por NADA se vio claramente reflejado por el aumento en la capacidad transactivadora de HIF-1 $\alpha$ .



**Figura 18. NADA induce la degradación de PHD3 y estabilización de HIF-1 $\alpha$ .** Células SK-N-SH fueron transfectadas con el vector EPO-Luc y 24 horas después estimuladas con NADA (10  $\mu$ M) a los tiempos indicados. Posteriormente fueron lisadas y los niveles de HIF-1 $\alpha$ , PHD2 y PHD3 analizados mediante western blot (panel izquierdo) y la expresión de luciferasa estudiada en paralelo (panel derecho). Los resultados muestra la media  $\pm$  DS de 3 experimentos. \* $P$  = 0.0039, \*\* $P$  < 0.0001.

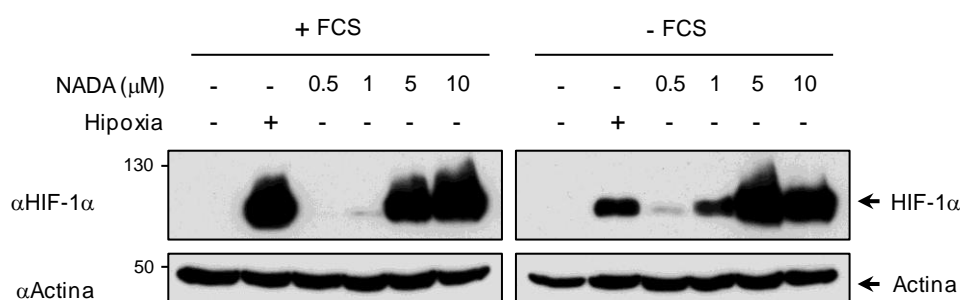
## 6.- NADA no sinergiza con la hipoxia en la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .

Seguidamente, estuvimos interesados en determinar si NADA afectaba a la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en respuesta a hipoxia. Para ello, repetimos experimentos similares al anterior, en este caso sometiendo a las células SK-N-SH a hipoxia en presencia o ausencia de NADA. Como se muestra en la figura 19, NADA provocó de nuevo la estabilización de HIF-1 $\alpha$  a niveles similares a los obtenidos bajo condiciones de hipoxia, y la combinación de ambos estímulos no produjo cambios significativos en los niveles de HIF-1 $\alpha$ . De nuevo, los niveles de PHD2 prácticamente no se vieron afectados en respuesta a ambas condiciones, mientras que los niveles de PHD3 si se vieron claramente disminuidos en relación a la expresión de HIF-1 $\alpha$ . Como era de esperar, la actividad transcripcional de HIF-1 $\alpha$  medida a través del gen reportero EPO-Luc, no se vio afectada por el tratamiento de hipoxia de las células en presencia de NADA. En general, estos experimentos sugieren que la estabilización de HIF-1 $\alpha$  mediada por NADA se lleva a cabo a través de una ruta de señalización que está también activada en respuesta a hipoxia, sin afectar a la expresión de PHD2.



**Figura 19. NADA no sinergiza con hipoxia.** Células SK-N-SH fueron transfectadas con el vector EPO-Luc y 48 horas después sometidas a hipoxia y/o estimuladas con NADA (10  $\mu$ M) durante 6 horas. Las células fueron recogidas y una alícuota fue utilizada para determinar mediante western blot la expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$ , PHD2 y PHD3 (panel izquierdo). En paralelo, otra alícuota fue usada para estudiar la expresión de luciferasa (panel derecho). Los datos muestran la media y desviación estándar de tres experimentos. \* $P < 0.0001$ .

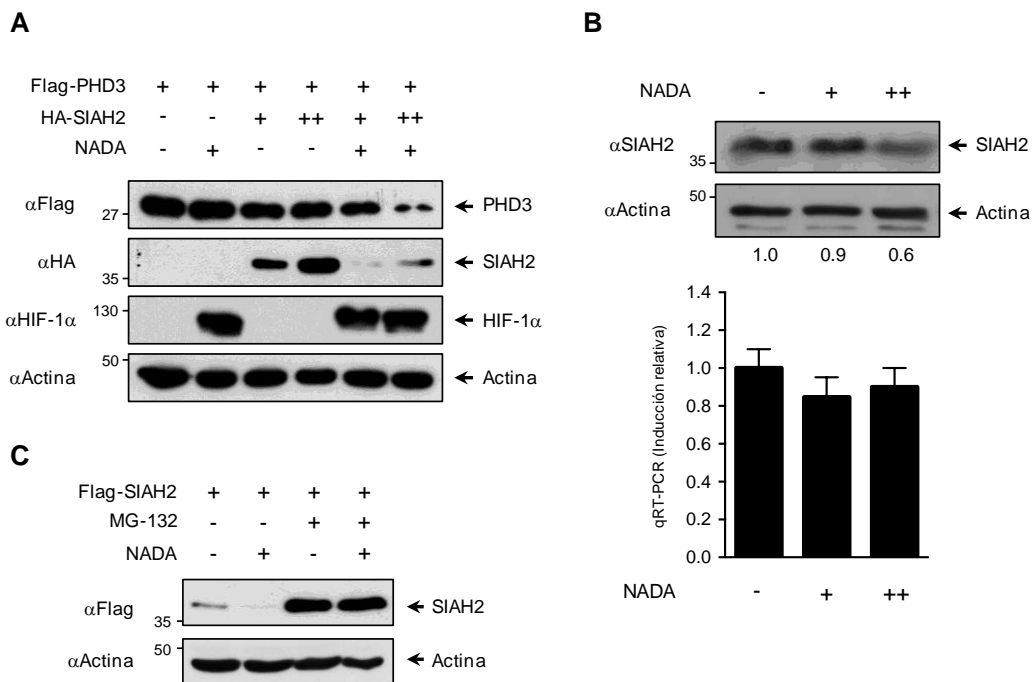
Una vez conocida la cinética de estabilización de HIF-1 $\alpha$  en respuesta a NADA, decidimos calcular el EC<sub>50</sub> (concentración de NADA que se necesita para que se exprese un 50% de la máxima expresión de proteína) a las 3 horas de estimulación (Figura 20). Debido a que los endocannabinoides pueden unirse a la albúmina presente en el suero, igualmente decidimos analizar si esta actividad puede influir en el potencial del NADA. Para ello, células SK-N-SH fueron crecidas durante 12 horas en medio de cultivo con y sin suero, y estimuladas con diferentes concentraciones de NADA. De nuevo los niveles de HIF-1 $\alpha$  fueron analizados mediante western blot y cuantificados mediante densitometría usando la expresión de  $\beta$ -actina como proteína normalizadora. En la figura 20 se muestra que NADA presentó un EC<sub>50</sub> de 2,6  $\mu$ M cuando las células fueron cultivadas en presencia de suero, viéndose reducido a 2,3  $\mu$ M en condiciones libre de suero.



**Figura 20. Determinación del EC<sub>50</sub> del NADA sobre la estabilización de HIF-1 $\alpha$ .** Células SK-N-SH fueron crecidas en medio con o sin suero durante 12 horas y luego fueron sometidas a hipoxia durante 6 horas o estimuladas con NADA a la concentración indicada durante 3 horas. La expresión de HIF-1 $\alpha$  fue analizada mediante western blot y los niveles de HIF-1 $\alpha$  cuantificados mediante densitometría.

## 7.- NADA afecta la expresión de SIAH2.

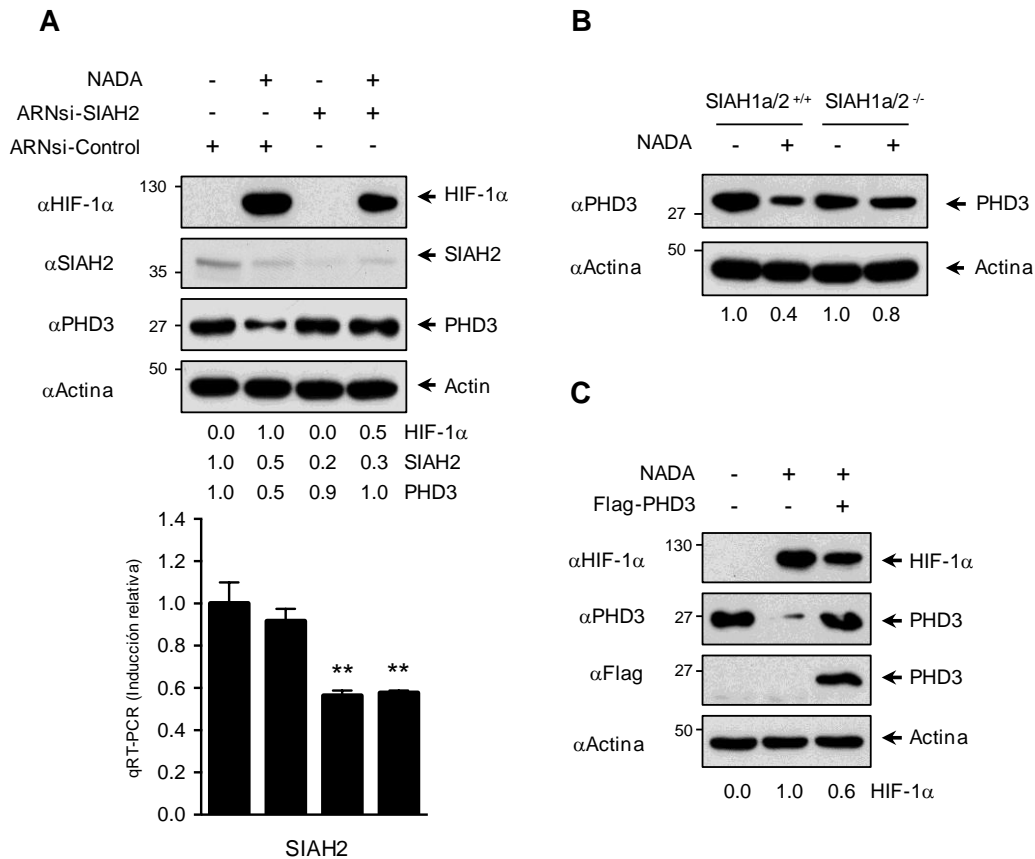
Para determinar cuál era el mecanismo de acción de NADA sobre la ruta de respuesta a hipoxia, decidimos analizar el efecto de esta *N*-acil dopamina sobre la proteína SIAH2. Como se ha comentado en la introducción, esta proteína es una E3 ubiquitina ligasa encargada de controlar los niveles de HIF-1 $\alpha$  principalmente a través de la regulación de los niveles de PHD3 en respuesta a baja concentración de oxígeno (entre 1% y 5% de O<sub>2</sub>). En un primer abordaje, expresamos en células HEK-293T diferentes cantidades de SIAH2 junto con PHD3 en presencia o ausencia de NADA. Como se puede ver en la figura 21A, la expresión de SIAH2 degradó a PHD3 de manera dosis dependiente, mientras que los niveles de HIF-1 $\alpha$  no cambiaron significativamente. Contrario a nuestras expectativas, la estimulación con NADA produjo una clara inhibición de la expresión de SIAH2, la cual se vio igualmente acompañada de nueva disminución aun más importante de los niveles de PHD3. A la vista de estos resultados, decidimos investigar el efecto de NADA sobre SIAH2 endógeno tanto a nivel de proteína como de ARNm. Tal y como se muestra en la figura 21B, el estímulo con NADA produjo una clara disminución de manera dosis dependiente en los niveles de proteína SIAH2. Por el contrario, no observamos ninguna alteración significativa en la expresión génica de dicha proteína. Estos datos en su conjunto indicaban que NADA es capaz de afectar a SIAH2 a nivel de proteína. Para analizar más a fondo esta posibilidad expresamos SIAH2 en células HEK-293T, las cuales se trataron con NADA 10  $\mu$ M en presencia o ausencia del inhibidor del proteosoma MG-132 (Figura 21C). Como podemos observar, el tratamiento con NADA inhibió fuertemente la expresión de SIAH2 y este efecto fue abolido casi completamente en presencia de MG-132. Por lo tanto, nuestros datos indican que la degradación de SIAH2 mediada por NADA es llevada a cabo a través del proteosoma.



**Figura 21. La expresión de SIAH2 se ve afectada por NADA.** (A) Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos indicados para expresar PHD3 y diferentes cantidades de SIAH2. Después de 36 horas, se añadió NADA (10  $\mu$ M) durante 6 horas y las células se lisaron para medir la expresión de proteínas mediante western blot. (B) Células HEK-293T fueron estimuladas con NADA a concentraciones de 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M durante 6 horas. Pasado este tiempo, parte de las células fueron lisadas y se inmunoprecipitó la proteína SIAH2. La otra parte de las células fueron usadas para extraer ARN y analizar mediante qPCR el nivel de ARNm de SIAH2. Los datos muestran la media y DS de tres experimentos. Los valores presentados bajo los geles indican la señal de intensidad de la proteína SIAH2 evaluada por densitometría mediante el software ImageJ. Para obtener este resultado, se realizó una normalización con la señal de intensidad de la proteína  $\beta$ -actina. (C) Células HEK-293T fueron transfectadas para expresar SIAH2 y se estimularon con NADA 10  $\mu$ M tanto en presencia como en ausencia de MG-132 (10  $\mu$ M). El posterior lisado celular fue analizado mediante western blot.

### **8.- SIAH2 participa en la estabilización de HIF-1 $\alpha$ mediada por NADA a través de PHD3.**

Para demostrar la contribución de SIAH2 en la estabilización de HIF-1 $\alpha$  inducida por NADA, se silenció SIAH2 mediante el uso de siRNA y se analizaron los niveles de HIF-1 $\alpha$  junto a PHD3. Tal y como se muestra en la figura 22A, el silenciamiento de SIAH2 redujo drásticamente la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en respuesta al tratamiento con NADA. De manera paralela, esta inhibición de SIAH2 indujo la estabilización de PHD3 en las mismas condiciones experimentales. Un experimento similar realizado en células MEFs knockout para Siah1a/2 (Figura 22B) reveló que la degradación de PHD3 inducida por NADA fue más prominente en las células que si poseían Siah2. Ambos resultados confirman la participación de SIAH2 en el proceso de estabilización de HIF-1 $\alpha$  inducido por NADA. Finalmente, y para confirmar el papel de PHD3 en este proceso, decidimos comparar el efecto de sobre-expresar PHD3 en un experimento de estabilización de HIF-1 $\alpha$  por NADA, con la intención de restablecer sus niveles normales en ausencia de NADA. Como consecuencia, y tal como mostramos en la figura 22C, el restablecimiento de los niveles de PHD3 disminuyó la estabilización de HIF-1 $\alpha$  inducida por NADA, sugiriendo de nuevo la relevancia de esta proteína en este proceso. Estos resultados en su conjunto demuestran que SIAH2 y PHD3 juegan un papel relevante, pero no exclusivo, en la estabilización de HIF-1 $\alpha$  mediada por NADA. No obstante, no podemos descartar que otras proteínas con función similar como SIAH1 y PHD1 podrían también exhibir redundancia funcional en este proceso.

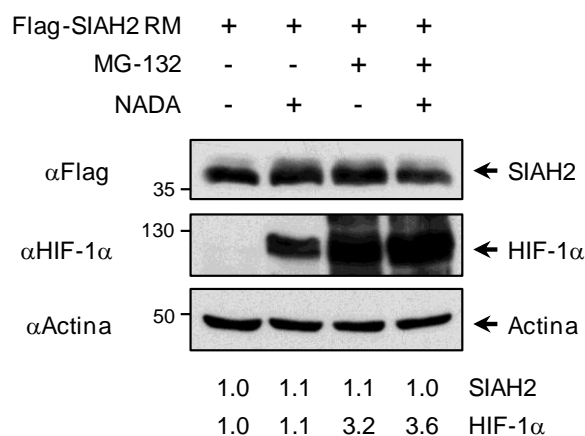


**Figura 22. SIAH2 contribuye a la estabilización de HIF-1α a través de PHD3.** (A) Células HEK-293T fueron transfectadas con 100 nM de siRNA para SIAH2 o la misma cantidad de silenciador control. Después de 4 días, las células fueron estimuladas con NADA 10 μM durante 6 horas y una fracción fue utilizada para analizar los niveles endógenos de las diferentes proteínas. El resto de las células fue utilizada para analizar los niveles de ARNm de SIAH2 mediante qPCR. Los datos representan la media y desviación estándar de tres experimentos diferentes. \*\* $P < 0.001$ . El valor indicado debajo de los geles indica la señal de intensidad de las proteínas SIAH2, PHD3 y HIF-1α después de ser normalizadas con la intensidad de señal de la β-actina. (B) Células MEFs silvestres y knockout para *Siah1a/2* fueron tratadas durante 6 horas con NADA 10 μM, luego se lisaron y se evaluó la expresión de PHD3 mediante western blot. Los valores debajo de los geles indican la intensidad de señal de la proteína PHD3 tras la normalización con la señal de β-actina. (C) Células HEK-293T fueron transfectadas con PHD3 para obtener un nivel similar al endógeno tras el tratamiento con NADA 10 μM durante 6 horas. Las células fueron lisadas, y la expresión de proteínas evaluada mediante western blot. Los valores debajo de los geles muestran la señal de intensidad de la proteína HIF-1α después de la normalización con β-actina.

## 9.- NADA incrementa la actividad de SIAH2.

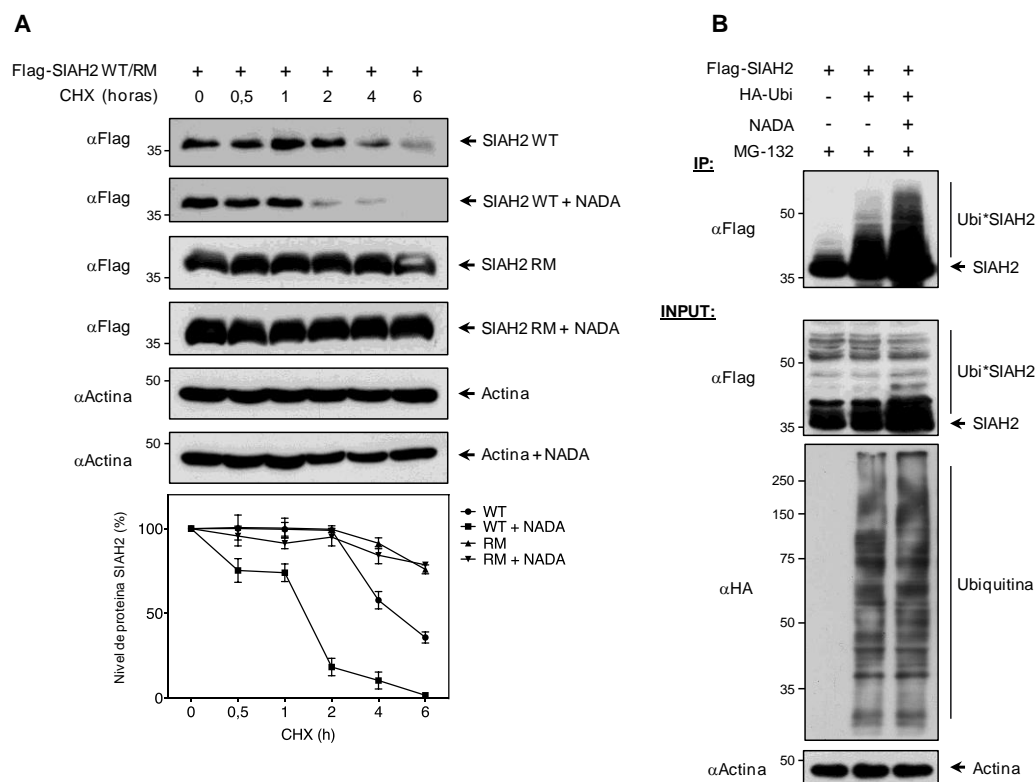
¿Están las *N*-acil dopaminas afectando a la actividad de SIAH2? Una de las principales características de las E3 ubiquitina-ligasas de dominio RING es su capacidad de limitar su propia disponibilidad a través de un proceso de auto-ubiquitinación y por lo tanto de auto-degradación (Hu & Fearon, 1999). La capacidad mostrada anteriormente de NADA para inhibir tanto la expresión de SIAH2 como igualmente la de su sustrato PHD3, nos llevó a considerar la posibilidad de que esta *N*-acil dopamina estuviera incrementando la actividad ligasa de SIAH2 y por consiguiente aumentando su propia degradación y la de sus sustratos. Para comprobar esta hipótesis, primero analizamos el efecto del NADA sobre una variante de la proteína SIAH2 que presenta una mutación puntual en el dominio RING (H98A/C101A) que la hace deficiente

en su actividad ligasa (SIAH2-RM). Como se muestra en la Figura 23, NADA no afectó a la estabilidad de la proteína SIAH2-RM en presencia o ausencia del inhibidor de proteosoma MG-132. De manera similar a los resultados anteriores, NADA si fue capaz de producir la estabilización de HIF-1 $\alpha$ . Este resultado soporta la hipótesis de que NADA puede afectar a la auto-degradación de SIAH2, ya que para observar su efecto es necesario que la actividad ligasa de SIAH2 se mantenga intacta.



**Figura 23. NADA no ejerce ningún efecto sobre un mutante de SIAH2 carente de actividad ligasa.** Células HEK-293T fueron transfectadas para expresar la proteína SIAH2-RM y tras 36 horas fueron estimuladas con NADA (10  $\mu$ M) en presencia o ausencia de MG-132. Después de 6 horas, las células fueron lisadas y la expresión de SIAH2 y HIF-1 $\alpha$  se analizó mediante western blot. Los valores debajo de los geles indican la intensidad de señal de las proteínas SIAH2 y HIF-1 $\alpha$  después de ser normalizadas frente a  $\beta$ -actina.

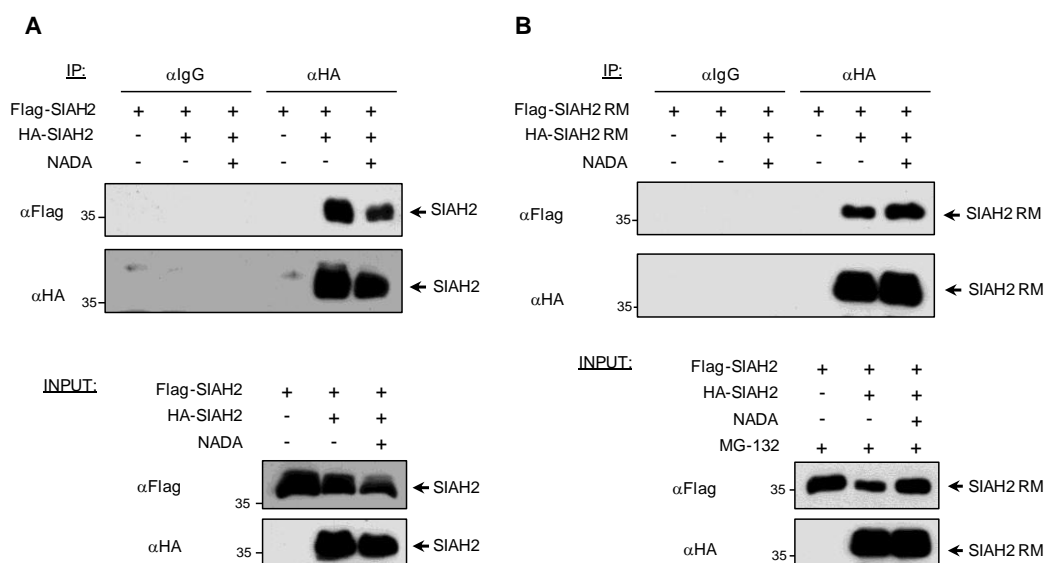
A continuación, y para determinar si NADA altera la estabilidad de SIAH2, decidimos analizar la vida media de esta proteína en presencia de CHX (Figura 24A). Para ello, las células HEK-293T fueron transfectadas con SIAH2 y su mutante carente de actividad ligasa SIAH2-RM, siendo seguidamente estimuladas con NADA. Tal y como se muestra en la figura 24A, NADA redujo la vida media de SIAH2 desde 6 a 3 horas. Por el contrario, no se produjeron cambios significativos en el caso de SIAH2-RM. Estos datos una vez más sugieren que la capacidad del NADA para reducir la estabilidad de SIAH2 se debe a su capacidad para incrementar la actividad E3 ligasa de SIAH2. En este sentido, y para demostrar de manera directa que NADA incrementa la actividad de SIAH2 afectando a su auto-ubiquitinación, decidimos analizar los niveles de ubiquitinación de SIAH2 en presencia o ausencia de NADA (Figura 24B). Para ello analizamos mediante inmunoprecipitación y posterior western blot el estado de ubiquitinación de SIAH2 en presencia y ausencia de NADA. Para ello co-expresamos HA-Ubiquitina junto con SIAH2 en presencia o ausencia de NADA, inhibiendo el proteosoma mediante MG-132 para acumular formas ubiquitinadas de SIAH2. Como se muestra en la figura, NADA es capaz de estimular la poliubiquitinación basal de SIAH2, demostrando de nuevo su capacidad para incrementar la actividad de SIAH2.



**Figura 24. NADA incrementa la actividad de SIAH2.** (A) Células HEK-293T fueron transfectadas para expresar la proteína SIAH2 ó SIAH2-RM. Después de 36 horas fueron tratadas con cicloheximida (CHX) a una concentración de 40  $\mu$ g/ml durante 0,5, 1, 2, 4 y 6 horas tanto en presencia de NADA (10  $\mu$ M) como en ausencia de este. A tiempo final, las células se lisaron y se analizó mediante western blot la expresión proteica. El gráfico representa la media y desviación estándar de tres experimentos diferentes. (B) Células HEK-293T fueron transfectadas para expresar la proteína SIAH2 y ubiquitina, 36 horas después fueron estimuladas con NADA (10  $\mu$ M) en presencia de MG-132. Tras 6 horas, una fracción de las células fueron lisadas y sometidas a western blot para observar la ubiquitinación de SIAH2 (Input). La otra fracción de las células fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación usando anticuerpo anti-Flag. Finalmente, tras la elución, la proteína SIAH2 fue detectada mediante western blot.

## 10.- NADA no afecta ni a la dimerización de SIAH2 ni a su regulación a través de la ruta AKT.

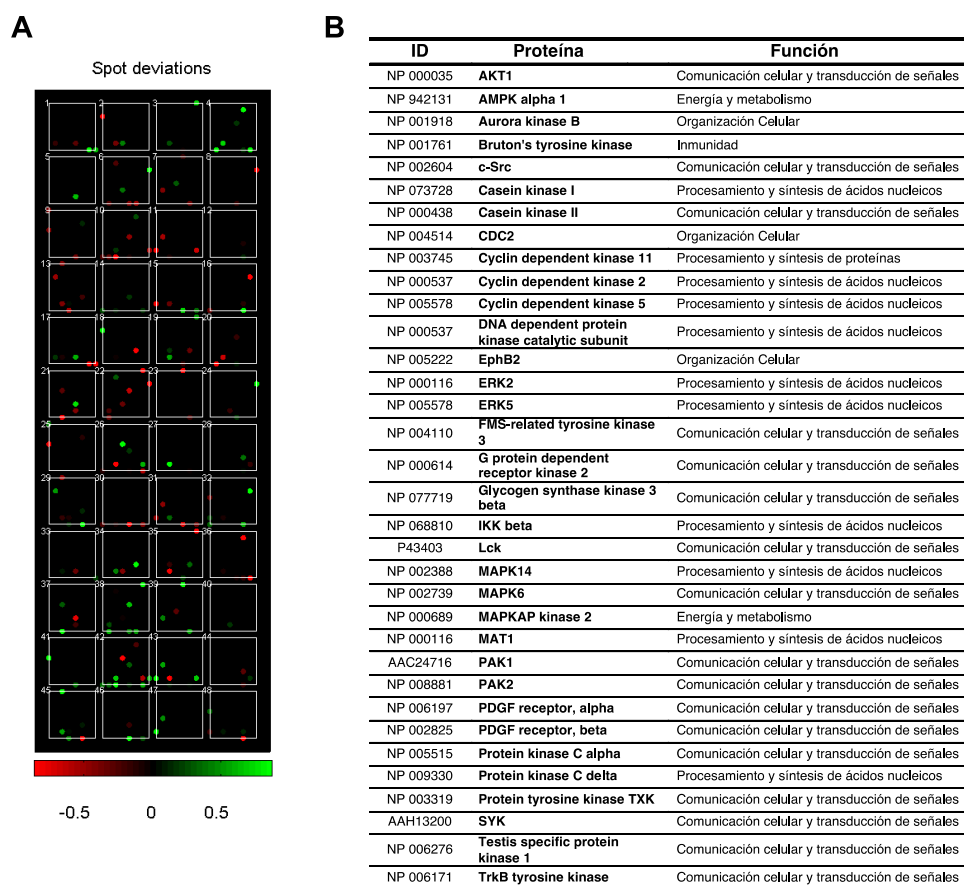
Para intentar determinar cómo NADA estaba afectando a la actividad de SIAH2 se realizaron una nueva serie de experimentos. En primer lugar, exploramos la posibilidad de que NADA pudiera estar alterando la dimerización de SIAH2, uno de los mecanismos reguladores clave capaces de controlar su actividad catalítica. Para ello, realizamos experimentos de co-inmunoprecipitación entre Flag-SIAH2 y HA-SIAH2 en células HEK-293T. Como se muestra en la figura 25A, Flag-SIAH2 y HA-SIAH2 mostraron una fuerte interacción tanto en presencia como en ausencia de NADA. Del mismo modo, no se observaron diferencias entre la expresión de SIAH2 tras la inmunoprecipitación en presencia de NADA y los niveles en el input, indicando por tanto que el proceso de dimerización no se ve afectado. Resultados similares se obtuvieron usando el mutante en la actividad ligasa SIAH2-RM (Figura 25B).



**Figura 25. NADA no afecta a la dimerización de SIAH2.** Células HEK-293T fueron transfectadas con Flag-SIAH2 y HA-SIAH2 (A) o los plásmidos equivalentes para SIAH2-RM (B), y estimuladas con NADA (10  $\mu$ M) durante 6 horas. Pasado este tiempo se lisaron las células y una fracción fue sometida a inmunoprecipitación (IP) usando anticuerpo anti-HA. Tras la elución, Flag-SIAH2 fue detectada mediante western blot. La fracción restante fue utilizada para analizar la presencia de las proteínas (INPUT).

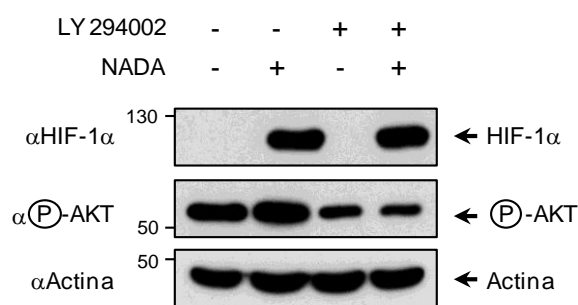
Seguidamente, realizamos una primera aproximación con el fin de identificar aquellas rutas de señalización involucradas en la estabilización de HIF-1 $\alpha$  mediada por NADA, y más específicamente aquellas que pudieran estar afectando directamente a la actividad de SIAH2. Para ello, decidimos analizar los posibles cambios sufridos en la actividad de quinasas celulares, proteínas responsables principalmente del control de la señalización celular. Para ello hemos realizado ensayos de péptido-quinasa array con sustratos celulares procedentes de células sin estimular o estimuladas con NADA. Estos chips contienen 1024 péptidos por triplicado con secuencias conocidas de sustratos de quinasas celulares. Tras un preciso proceso de cuantificación, identificamos un total de 34 quinasas cuya actividad podía estar modificada por la presencia de NADA. Un análisis de las posibles rutas implicadas en el proceso mediante el uso de Ingenuity Pathway Analysis (IPA) reveló una posible alteración en la ruta de señalización PI3K/AKT (Figura 26).





**Figura 26. Ensayo péptido-quinasa array.** (A) Cada chip contiene 1.024 péptidos por triplicado de secuencia conocida y aquellos que modificaron su patrón de fosforilación se detectaron mediante el uso de BioRad FX Imager en comparación con el control. (B) Listado de las proteínas quinasas identificadas cuya actividad podía estar modificada por la presencia de NADA.

A la vista de estos resultados, y a publicaciones previas que describen la participación de la ruta PI3K/AKT sobre la regulación de la expresión de SIAH2 (Nakayama et al, 2009), decidimos analizar el posible papel de esta ruta sobre la estabilización de HIF-1 $\alpha$  inducida por NADA. En este sentido, células HEK-293T fueron estimuladas con NADA en presencia del inhibidor de la PI3K quinasa LY294002, analizando posteriormente la expresión de la proteína AKT fosforilada junto con HIF-1 $\alpha$  mediante western blot. Como se puede observar en la figura 27, aunque NADA incrementó muy levemente los niveles de fosforilación de AKT, la estabilización de HIF-1 $\alpha$  mediada por NADA no se vio afectada por la presencia del inhibidor LY294002. Estos resultados indican que la ruta de AKT no está directamente involucrada en este proceso.

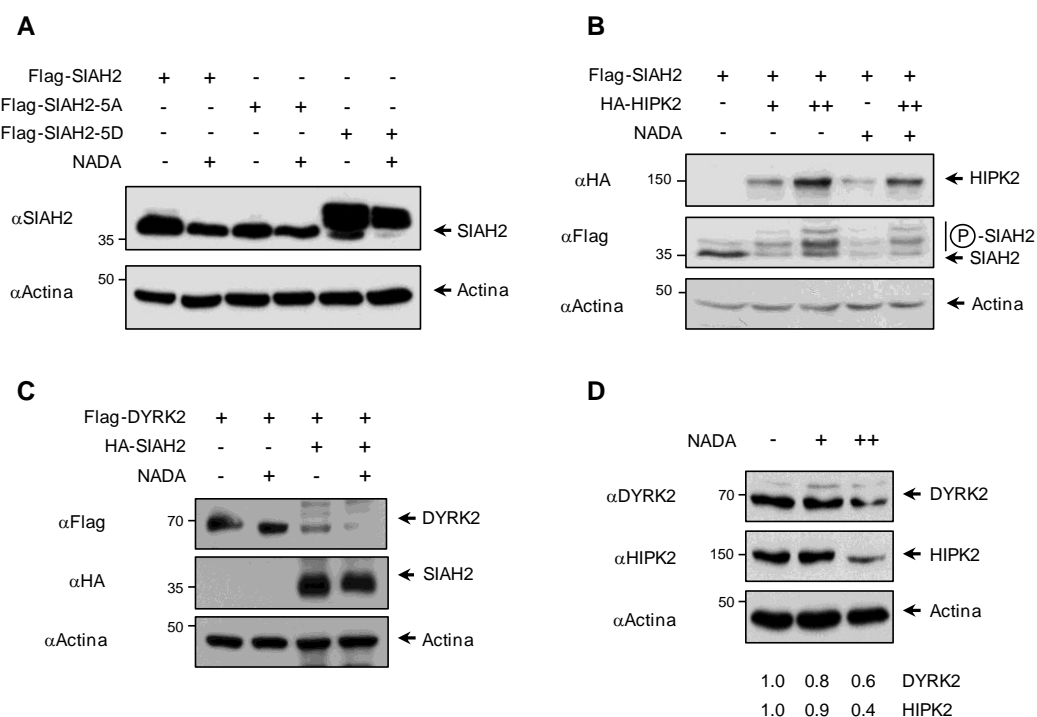


**Figura 27. La ruta de AKT no está involucrada en la estabilización de HIF-1 $\alpha$  mediada por NADA.**

Células HEK-293T fueron incubadas con el inhibidor de PI3K LY294002 a concentración 10  $\mu$ M durante 30 minutos antes del estímulo con NADA a concentración 10  $\mu$ M durante 6 horas. Tras este tiempo las células se lisaron y la expresión de las diferentes proteínas fue analizada mediante western blot.

### 11.- NADA no afecta a la fosforilación de SIAH2.

Como se ha comentado en la introducción, la fosforilación de SIAH2 es el mecanismo descrito hasta la fecha más importante de regulación de la actividad de esta ubiquitina ligasa. En este sentido, se han identificado varias quinasas capaces de fosforilar a SIAH2 en diferentes residuos, alterando significativamente su actividad sobre diferentes sustratos (Calzado et al, 2009; Khurana et al, 2006; Pérez et al, 2012). Por este motivo, en primer lugar nos preguntamos si el nivel de fosforilación de SIAH2 pudiera jugar un papel clave en la capacidad del NADA para alterar la estabilidad de esta proteína. Para ello, analizamos la capacidad del NADA de alterar la estabilidad de SIAH2-WT, en comparación con diferentes mutantes de SIAH2 donde todos los sitios de fosforilación descritos hasta la actualidad han sido mutados a alanina (SIAH2-5A: Ser16, Thr26, Ser28, Ser68 y Thr119), o bien están mutados a ácido aspártico mimetizando un estado de completa fosforilación (SIAH2-5D). Para ello, células HEK-293T fueron transfectadas con Flag SIAH2-WT, Flag SIAH2-5A y Flag SIAH2-5D y tratadas con NADA. Como se muestra en la figura 28A, la estabilidad de SIAH2 en todos los casos fue inhibida por NADA de una manera similar. En paralelo, analizamos la capacidad de NADA para afectar a los niveles de fosforilación de SIAH2 mediados por la quinasa HIPK2 y DYRK2 (Figura 28B, C y D). En ambos casos, NADA no afectó a los niveles de fosforilación mediados por ambas quinasas. Por el contrario, si observamos como NADA induce una clara inhibición de la expresión de ambas quinasas, tanto cuando están sobre-expresadas como a nivel endógeno. Ambas quinasas han sido descritas como sustratos específicos de SIAH2, lo cual de nuevo vuelve a demostrar la capacidad de NADA de aumentar la actividad de SIAH2. Todos estos resultados en su conjunto indican que la fosforilación de SIAH2 no está involucrada en el mecanismo de acción del NADA.

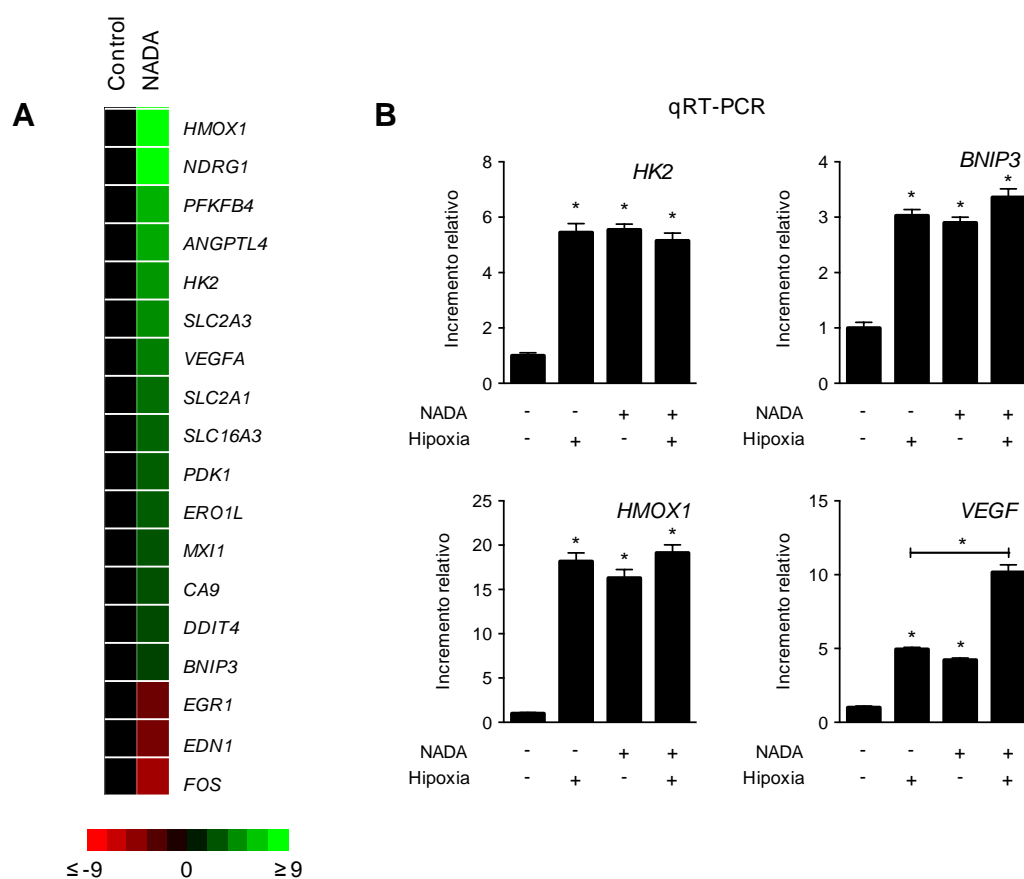


**Figura 28. NADA no afecta a la fosforilación de SIAH2.** (A) Células HEK-293T fueron transfectadas con los vectores de expresión que codifican para Flag-SIAH2 y los mutantes Flag-SIAH2-5A y Flag-SIAH2-5D. Tras 36 horas las células fueron estimuladas con NADA (10  $\mu$ M) durante 10 horas, lisadas y la expresión de las diferentes proteínas analizadas mediante western blot con los anticuerpos indicados. (B) Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos indicados, y tras 36 horas tratadas con 10  $\mu$ M de NADA durante 10 horas. Posteriormente fueron lisadas y la expresión de proteínas analizadas mediante western blot con los anticuerpos indicados. (D) Células MO3.13 fueron estimuladas con NADA (+, 1  $\mu$ M; ++, 10  $\mu$ M) durante 6 horas, lisadas y la expresión tanto de HIPK2 como de DYRK2 analizadas mediante western blot con los anticuerpos indicados. Los valores mostrados bajo los geles indican la intensidad de señal cuantificada tras normalizar frente a la expresión de actina. (C) Células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos indicados, y después de 36 horas tratadas con NADA a 10  $\mu$ M durante 10 horas. Las células fueron posteriormente lisadas, y la expresión de las diferentes proteínas evaluadas mediante western blot con los anticuerpos indicados.

## 12.- NADA incrementa la expresión de genes neuroprotectores y la supervivencia celular en respuesta a hipoxia.

Finalmente, para analizar las consecuencias fisiológicas más directas de la estabilización de HIF-1 $\alpha$  mediada por NADA, decidimos en primer lugar estudiar su efecto sobre la expresión de genes directamente relacionados con la respuesta a la falta de oxígeno. Para ello, estimulamos astrocitos primarios humanos con NADA a una concentración 10  $\mu$ M durante 6 horas, realizando con posterioridad un qPCR-array que incluye 84 genes involucrados directamente en la ruta de respuesta a hipoxia. Tal y como se muestra en la figura 29A, tras el primer análisis 18 genes mostraban cambios significativos a la estimulación con NADA cuando se comparó con la situación de normoxia. Es importante destacar el cambio de expresión sufrido en respuesta a NADA por genes dianas de HIF-1 $\alpha$  como son *HMOX1*, *HK2*, *VEGFA* y *BNIP3*, los cuales están directamente relacionados con la supervivencia celular y la neuroprotección. Seguidamente, decidimos analizar en detalle la expresión de un seleccionado número de estos genes mediante qPCR, para de esta manera determinar con mayor precisión

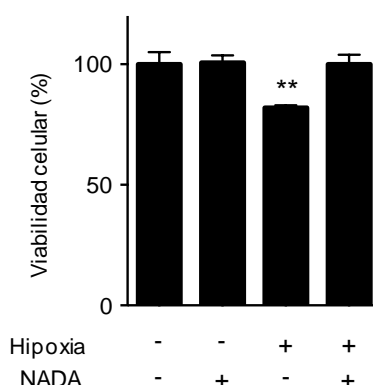
si NADA afecta a su regulación usando de nuevo astrocitos primarios humanos. Como se muestra en la figura 29B, NADA induce la expresión de *HMOX1*, *HK2* y *BNIP3* a niveles similares a los obtenidos bajo condiciones de hipoxia, mientras que la combinación de ambos estímulos no produjo ningún cambio significativo. Por el contrario, si observamos que se produce una sinergia entre los dos estímulos en el caso de la expresión de *VEGFA*, gen responsable de la síntesis del factor de crecimiento endotelial vascular, proteína clave implicada en el control de la vasculogénesis y la angiogénesis.



**Figura 29. NADA incrementa la expresión de genes neuroprotectores.** (A) Astrocitos primarios humanos fueron estimulados con NADA (10  $\mu$ M) durante 6 horas, siendo posteriormente analizada la expresión de genes involucrados en la ruta de respuesta a hipoxia mediante qPCR-array. Mapa colorimétrico muestra los genes sobreexpresados (verde) y desregulados (rojo) en células tratadas con NADA comparadas con el control. (B) Astrocitos primarios humanos fueron estimulados con NADA, hipoxia o ambos durante 6 horas y los niveles de ARNm de los genes *HK2*, *BNIP3*, *HMOX1* y *VEGF* fueron analizados mediante qPCR. Los datos muestran la media y desviación estándar de tres experimentos. \* $P < 0.0001$ .

Seguidamente y para evaluar la posible capacidad de las *N*-acil dopaminas para inducir supervivencia celular en respuesta a hipoxia, decidimos investigar el potencial efecto citoprotector del NADA en un modelo *in vitro* de muerte celular inducida por hipoxia (Carmeliet et al, 1998; Yamaguchi et al, 2002). Para ello, células SK-N-SH fueron pre-tratadas o no con NADA durante 3 horas y luego sometidas a hipoxia durante 3 horas más. Como se muestra en la figura 30, el NADA por sí solo no afectó a la viabilidad celular. Por el contrario, si fue capaz

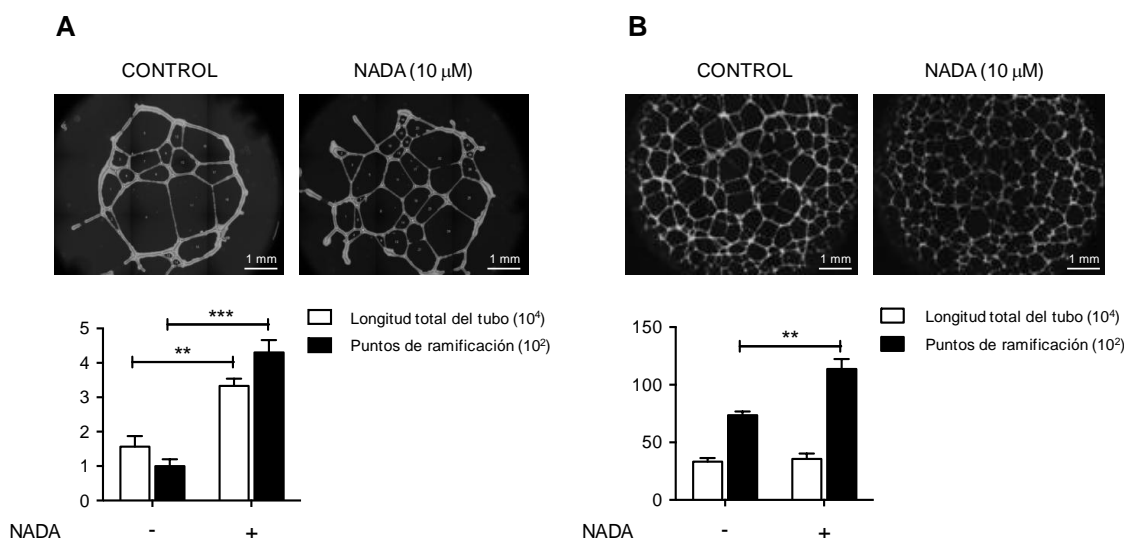
de proteger de manera significativa ( $P = 0.0036$ ) a las células de la citotoxicidad inducida por la hipoxia.



**Figura 30. NADA protege de la muerte celular inducida por hipoxia.** Células SK-N-SH se trataron o no con NADA (10  $\mu$ M) durante 3 horas y luego fueron sometidas a hipoxia durante 3 horas más. Tras este tiempo, se midió la viabilidad celular mediante un ensayo MTT. Los datos muestran la media y desviación estándar de cuatro experimentos. \*\* $P= 0.0036$ .

### 13.- Actividad angiogénica de NADA.

Con el objetivo de comprobar las consecuencias funcionales de la estimulación con NADA analizamos la formación de túbulos de células endoteliales en un modelo de angiogénesis. Para ello utilizamos dos tipos de modelos celulares, por una lado células endoteliales humanas derivadas de venas umbilicales (HUVECs) (Figura 31A), y en paralelo células endoteliales humanas microvasculares de cerebro (HBMECs) (Figura 31B). Ambas células fueron estimuladas con NADA a una concentración de 10  $\mu$ M durante 6 horas y la formación de túbulos fue cuantificada usando un microscopio BD Pathway™ Bioimager. Tal y como se puede observar en la figura 31 el estímulo con NADA resultó en un claro incremento del número de ramificaciones de los túbulos en ambas líneas celulares (HUVEC y HBMEC). Del mismo modo, observamos un incremento significativo de la longitud total de los túbulos en las células HUVEC, el cual no se observó en las células HBMEC.

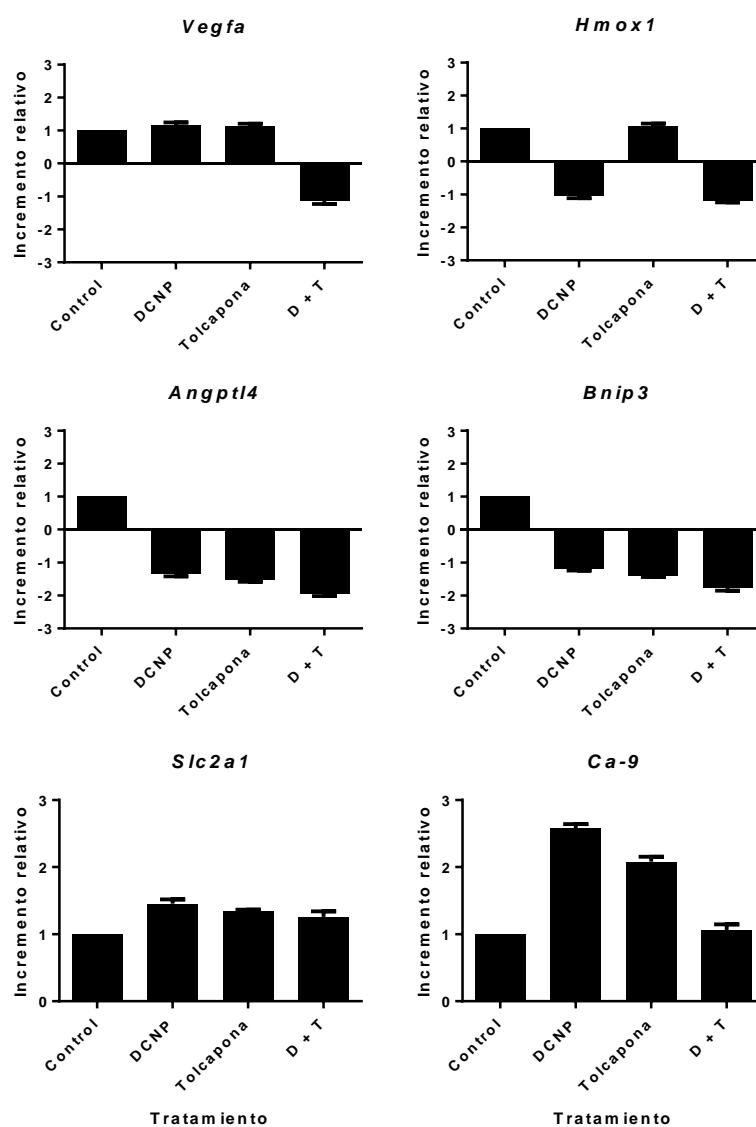


**Figura 31. NADA incrementa la angiogénesis.** Células HUVECs y HBMEC fueron sembradas en placas sobre una capa de matriz extracelular BD Matrigel™ y tratadas con NADA (10  $\mu$ M) durante 6 horas. El análisis cuantitativo de la formación de túbulos fue realizado con un microscopio BD Pathway™ Bioimager 855 usando el software Attovision v1.7. (A) Los datos muestran la media y desviación estándar de 3 experimentos. \*\* $P = 0.0029$ , \*\*\* $P = 0.0002$ . (B) Los datos muestran la media y desviación estándar de 3 experimentos. \*\* $P = 0.0017$ .

#### 14.- El tratamiento con Tolcapona y DCNP no aumenta la expresión de genes relacionados con la ruta de respuesta a hipoxia.

El compuesto 3,4-dihidroxi-5-nitrofenil (Tolcapona) ha sido descrito como un inhibidor de la enzima catecol-O-metil transferasa (Bonifácio et al, 2007), ya que actúa como un sustrato competitivo de la enzima. Por otro lado, el compuesto 2,6-Dicloro-4-nitrofenol (DCNP) fue descubierto como un inhibidor de la sulfatación de la dopamina actuando también como un sustrato alternativo (e inhibidor por lo tanto) pero en este caso de la enzima aril sulfotransferasa (AST) (Seah & Wong, 1994). Por tanto, con el objetivo de intentar elevar los niveles endógenos de NADA en el SNC realizamos una primera aproximación experimental tratando ratones con Tolcapona, con DCNP y con una combinación de ambos a concentraciones efectivas en otros modelos y a un solo tiempo. Ya que los niveles endógenos de NADA son extremadamente difíciles de medir dada la corta vida media del mismo en tejidos, decidimos investigar por qPCR la expresión de genes regulados por HIF-1 $\alpha$  (*Hmox1*, *Vegfa*, *Bnip3*, *Angptl4*, *Slc2a1* y *Ca-9*) como marcadores subrogados del potencial aumento de NADA inducido por la inhibición farmacológica de su catabolismo. Con este diseño experimental solo encontramos cambios significativos en la expresión de *Ca-9* tanto en respuesta a DCNP como a tolcapona. Sin embargo esta inducción no se observó cuando los dos compuestos se administraron de manera conjunta. Aunque *Ca-9* es regulado por HIF-1 $\alpha$ , no parece que este sea el mecanismo de acción responsable del efecto de DCNP y Tolcapona ya que los otros genes analizados dependientes de HIF-1 $\alpha$  no mostraron cambios con el mismo tratamiento. Este resultado, en principio, no se correlaciona con un incremento de NADA endógeno por inhibición de su catabolismo y se necesitarán nuevos experimentos incluyendo otros regímenes terapéuticos

(tiempos y dosis) para confirmar que el catabolismo de NADA pueda estar mediado por COMT y AST *in vivo*.



**Figura 32. Los tratamientos de DCNP y Tolcapona no logran incrementar la expresión de genes dependientes de HIF-1 $\alpha$ .** Los tratamientos con estos compuestos no inducen una expresión significativa de genes regulados por HIF-1 $\alpha$ , con la excepción del gen *Ca-9*. Los datos muestran la media y desviación estándar.

*DISCUSIÓN*

---





## VII.- DISCUSIÓN.

El papel de los endolípidos como moléculas de señalización se ha convertido en uno de los campos más interesantes de la farmacología moderna. Estas moléculas son reconocidos mediadores de las comunicaciones intra y extracelulares. Dentro de este grupo de mediadores se ha prestado especial atención a la síntesis, catabolismo y funciones biológicas de los ligandos lipídicos del CB<sub>1</sub>. El primer ligando endógeno de este receptor fue la AEA, que representa el prototipo de las *N*-acil etanolamidas, la cual es una familia de lípidos señalizadores que difieren en la longitud y grado de saturación de su cadena hidrocarbonada.

Recientemente una nueva familia de ligandos lipídicos que actúan sobre el sistema endocannabinoide ha sido identificada. Este familia de compuestos, denominada *N*-acil-aminoácidos/neurotransmisores (NAANs), difiere de la AEA en que la etanolamida es sustituida por glicina, GABA o dopamina. Estos NAANs están distribuidos diferencialmente en diferentes órganos, su expresión está altamente regulada en el cerebro y presentan una amplia variedad de funciones biológicas en el SNC, en células del endotelio vascular y en el sistema inmune. Sin embargo, la mayoría de sus efectos fisiológicos están aún por descubrirse. Dentro de la familia de NAANs, las *N*-acil-dopaminas como NADA y OLDA son de especial relevancia por ser activadores duales de los receptores CB<sub>1</sub> y TRPV-1, los cuales están altamente expresados en el SNC.

Los endocannabinoides y los diferentes NAANs parecen jugar un importante papel en neuroprotección por participar en la regulación de la comunicación celular entre el SNC y el sistema inmune en los procesos neuroinflamatorias y de daño neuronal (Skaper & Facci, 2012). Sin embargo, los mecanismos exactos por los cuales estos mediadores lipídicos ejercen su función aún están lejos de ser completamente identificados.

Como se ha comentado en la introducción, NADA se ha identificado en varias áreas del cerebro y se ha sugerido que puede jugar un papel relevante en la fisiopatología del dolor y la neuroinflamación (Huang et al, 2002b). Así, en diferentes modelos experimentales se ha mostrado que el NADA es un endocannabinoide con actividad pleiotrópica a través de mecanismos dependientes e independientes de los receptores CB<sub>1</sub> y TRPV-1. NADA tiene actividad cannabimimética en ratones produciendo la clásica tétrada de síntomas producidos por la activación del CB<sub>1</sub> (Bisogno et al, 2000). Además, induce hiperalgesia (Huang et al, 2002b), contracción del músculo liso bronquial y de la vejiga (Harrison et al, 2003), vasodilatación periférica (O'Sullivan et al, 2004), stress oxidativo y apoptosis en células hepáticas estrelladas (Wojtalla et al, 2012). Por último, se ha demostrado que el NADA también tiene actividades anti-HIV, neuroprotectoras y antiinflamatorias (Navarrete et al, 2009; Navarrete et al, 2010; Sancho et al, 2005; Sancho et al, 2004). Los análogos saturados de NADA como *N*-palmitoil-dopamina (PALDA) y *N*-estearoil-dopamina (STEARDA) también han sido identificados por su capacidad de hacer efecto "entourage" con NADA sobre el TRPV-1 (Chu et al, 2003).

El daño neuronal derivado de una lesión cerebral como puede ser la hipoxia cerebral o un proceso neurodegenerativo, es un proceso complejo que implica cambios inflamatorios. La activación de un mecanismo común relacionado con la supervivencia o muerte celular, mediado por la estabilización y transactivación de HIF-1 $\alpha$  ha sido observado en estas condiciones de daño neuronal. Así, es conocido que la activación de HIF-1 $\alpha$  es una respuesta del SNC para protegerse frente a un daño hipóxico que puede ocurrir no solo en los infartos cerebrales (anoxia aguda) sino también en situaciones de inflamación crónica donde la hipoxia está más restringida a localizaciones anatómicas y tipos celulares específicos (ej. Parkinson, Esclerosis Múltiple, ...). Por ejemplo, se ha descrito que la inducción de HIF-1 $\alpha$  por glucocorticoides es uno de los mecanismos de protección de oligodendrocitos primarios frente a estímulos excitotóxicos que ocurren en patologías neuroinflamatorias como la Esclerosis Múltiple (Sun et al, 2010).

Aunque en la actualidad hay una mayor comprensión de los mecanismos involucrados en los procesos de muerte celular asociada con la hipoxia-isquemia (HI) cerebral, todavía no existen terapias eficaces. Algunas aproximaciones terapéuticas que tienen como objetivo una neuroprotección a largo plazo incluyen factores neurotróficos, corticosteroides, antagonistas de los receptores de glutamato y la hipotermia (Almli et al, 2000; Bona et al, 1998). Durante mucho tiempo el estrés leve ha sido conocido por "condición previa" o preconditionamiento hipóxico (HP) para proteger contra un posterior daño cerebral (Gidday, 2006). Los tratamientos que pueden inducir una protección contra la posterior aparición de lesiones incluyen isquemia leve (Simon et al, 1993), hipertermia (Ota et al, 2000), lipopolisacárido bacteriano (Eklind et al, 2005) e hipoxia (Bergeron et al, 2000). La tolerancia producida por HP está mediada por la activación de HIF-1 $\alpha$  y la inducción de genes involucrados en la eritropoyesis, angiogénesis, transporte de glucosa y glicólisis anaeróbica (Speer et al, 2013). Después de la exposición a una hipoxia suave o a hipoximiméticos tales como el cloruro de cobalto o la desferrioxamina, la expresión de HIF-1 $\alpha$  y de genes regulados por este factor se encuentra elevada en el cerebro (Jones et al, 2008). Además, el PH con ambos hipoximiméticos previene del daño cerebral inducido por hipoxia severa y favorece la posterior recuperación funcional (Speer et al, 2013). Las proteínas PHDs son las responsables de la degradación dependiente de oxígeno de HIF-1 $\alpha$  y también funcionan como sensores del metabolismo celular (Aragónés et al, 2009). Por lo tanto, la inhibición de las PHDs mediante pequeñas moléculas hipoximiméticas representa una interesante estrategia para el desarrollo de terapias neuroprotectoras y para la prevención frente a condiciones hipóxicas (Speer et al, 2013).

En nuestro laboratorio hemos descrito previamente que el NADA y el OLDA también previenen la activación de NF- $\kappa$ B por inhibir la fosforilación de p65/RelA (Sancho et al, 2004). Aunque el papel de NF- $\kappa$ B en neuroprotección ha sido controvertido, se ha demostrado que la inhibición de NF- $\kappa$ B provoca un estado de neuroprotección en diferentes modelos experimentales. La activación de NF- $\kappa$ B en la microglía ha sido propuesta para promover el

daño cerebral a través de la inducción de citoquinas proinflamatorias (Harari & Liao, 2010). Además, hay evidencias que indican que la activación de NF- $\kappa$ B en neuronas contribuye a una protección neuronal inducida por isquemia (Xu et al, 2012). Por lo tanto, las *N*-acil dopaminas pueden ejercer una actividad neuroprotectora a través de mecanismos pleiotrópicos que incluyen al menos la inducción de HIF-1 $\alpha$ , la inhibición de NF- $\kappa$ B y la activación de CB1.

¿Cual es por tanto el mecanismo responsable del efecto observado de las *N*-acil dopaminas en este trabajo? Hasta la actualidad, entre los diferentes mecanismos capaces de modificar la expresión y actividad de los diferentes miembros de la familia de proteínas SIAH se incluyen cambios en los niveles de glucosa, daño al ADN, apoptosis e hipoxia (Carlucci et al, 2008; Fiucci et al, 2004; Nakayama et al, 2004; Winter et al, 2008; Yego & Mohr, 2010). Aunque en la literatura no hay muchos datos publicados sobre los mecanismos de regulación de SIAH2 a nivel transcripcional en respuesta a estos estímulos, si hay múltiples evidencias de su regulación a nivel post-transcripcional (MacLeod et al, 2007; Topol et al, 2003; Xie et al, 2009). Por ejemplo, se ha descrito que la activación de la ruta de AKT incrementa los niveles de SIAH2 a nivel transcripcional y modula la respuesta a hipoxia a través de la degradación de PHD3 y estabilización de HIF-1 $\alpha$  (Nakayama et al, 2009). Sin embargo, en nuestros experimentos la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en respuesta NADA no se afectó en presencia del inhibidor de PI3K/AKT LY 29400, sugiriendo que el efecto de NADA sobre dicha estabilización es independiente de AKT. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que NADA pueda tener alguna influencia sobre esta ruta de señalización.

Entre las modificaciones postraduccionales descritas hasta la fecha que son capaces de regular SIAH2, destaca su capacidad de auto-ubiquitinarse bajo condiciones fisiológicas para limitar su disponibilidad y actividad (Depaux et al, 2006). Esta capacidad es regulada por otras modificaciones postraduccionales de SIAH2, tales como la fosforilación llevada a cabo por diferentes proteínas quinasa en respuesta a varios estímulos (Calzado et al, 2009; Pérez et al, 2012), así como por la acción de enzimas desubiquitinantes (Scortegagna et al, 2011). Nuestro grupo y otros investigadores han descrito algunas de las quinasas que son capaces de fosforilar a SIAH2, e incluyen a p38, HIPK2 y DYRK2, las cuales afectan a los residuos de serina 16, 28 y 69 y a los residuos de treonina 26 y 119 (Calzado et al, 2009; Grishina et al, 2012; Khurana et al, 2006). Así, en este trabajo hemos analizado en detalle el efecto de NADA directamente sobre la fosforilación y actividad de SIAH2 mediada por DYRK2 y HIPK2. Del mismo modo, hemos analizado el efecto del NADA en diferentes mutantes donde todos los sitios de fosforilación descritos han sido mutados a alanina o a ácido aspártico de modo que imite a un estado totalmente desfosforilado o a un estado de completa fosforilación respectivamente. Encontramos que los niveles de fosforilación y la estabilidad de SIAH2 fueron alterados por NADA de manera similar en todos los casos. En conjunto, estos datos indican que la fosforilación de SIAH2 en esos residuos no está involucrada en el mecanismo de acción del NADA. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que el NADA pueda tener acción sobre una quinasa no identificada capaz de fosforilar y modificar a SIAH2 y del mismo

modo, tampoco podemos descartar que el NADA pueda ejercer su efecto a través de la alteración de otro mecanismo de regulación postraduccional que podría mejorar la actividad de SIAH2.

Otro mecanismo que hemos estudiado en este trabajo fue la posible interacción directa entre las *N*-acil dopaminas y SIAH2. Hasta hoy, la menadiona (vitamina K3) es el único compuesto descrito que es capaz de inhibir la actividad de SIAH2, lo cual es posible debido a un efecto directo en su conformación (Shah et al, 2009). En el caso del efecto opuesto llevado a cabo por el NADA (incremento de actividad), aunque no lo hemos descartado totalmente de forma experimental, no parece que una interacción directa entre NADA y SIAH2 sea la explicación a nuestros resultados. Así, la incapacidad del NADA para alterar la interacción entre los dímeros de SIAH2, como la pérdida de efecto de la interacción de SIAH2 con algunos sustratos parece descartar esta posibilidad.

Dado que las concentraciones de NADA en condiciones normales y patológicas son desconocidas, es difícil especular sobre la relevancia fisiológica de nuestros hallazgos. Sin embargo, la relativa alta concentración de NADA (EC50: 2,6  $\mu$ M) requerida para la inducción de HIF-1 $\alpha$  no debería considerarse como una evidencia en contra del papel fisiológico para esta *N*-acil dopamina. El NADA fue detectado en el cuerpo estriado de rata a una concentración nanomolar, y del mismo modo se ha sido descrito que tiene una vida media muy corta, y por tanto los niveles fisiológicos no son fáciles de identificar de forma inequívoca (Hu et al, 2009; Huang et al, 2002b; Wojtalla et al, 2012). También es especialmente importante destacar que ciertos endocannabinoides pueden ejercer su actividad biológica en el interior de la célula, es decir, sin necesidad de ser secretada. Por ejemplo, se ha visto que la interacción de AEA con el TRPV-1 ocurre en una zona citoplásmica del mismo y además las concentraciones intracelulares de la AEA son más altas que las concentraciones extracelulares. Por ejemplo, Biswas y col. han demostrado que la AEA puede alcanzar hasta 50  $\mu$ M en las células del lugar de inflamación (Biswas et al, 2003). Por lo tanto, los niveles celulares de los endocannabinoides pueden ser superiores al encontrado en tejidos. Por todo ello, sería posible que un aumento de NADA pudiera inducir la activación de HIF-1 $\alpha$  en las mismas células productoras, y actuar de forma paracrina sobre otras células a través de la secreción de factores solubles neuroprotectores regulados por HIF-1 $\alpha$  como sería el caso de la eritropoyetina. Además, se ha mostrado que el llamado "efecto entourage" de endocannabinoides podría disminuir la concentración de *N*-acil dopaminas requerida para un efecto biológico específico.

Aunque las rutas de biosíntesis y catabolismo del NADA son poco conocidas, se ha sugerido que la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la tirosina hidroxilasa (TH) median la biosíntesis del NADA y la catecol-O-metil transferasa (COMT) regula su catabolismo (Hu et al, 2009). Sin embargo, se ha encontrado que en células hepáticas estrelladas la FAAH juega un papel en la degradación del NADA más que en la síntesis de este (Wojtalla et al, 2012). Además, la sulfatación de las *N*-acil dopaminas en hígado de rata y sistema nervioso por aril

sulfotransferasas (ASTs) ha sido sugerida también como un mecanismo involucrado en el catabolismo de NADA y OLDA, el cual puede ser diferente en los distintos tejidos (Akimov et al, 2009). Con el fin de investigar si la inhibición de la COMT y de las ASTs pudiera inducir la expresión de genes regulados por HIF-1 $\alpha$  como reflejo de un aumento de NADA endógeno, hicimos un experimento piloto en animales tratados con inhibidores de ambas enzimas. Los resultados mostraron que estos inhibidores no indujeron cambios en la expresión de genes regulados por HIF-1 $\alpha$ , indicando que los niveles endógenos de NADA no se habían incrementado, al menos a niveles capaces de inducir la estabilización HIF-1 $\alpha$ . Ya que los endocannabinoides en general se sintetizan bajo demanda, una posible explicación a estos resultados negativos es que NADA se debe inducir en primer lugar (i.e. estímulo patológico) y posteriormente la inhibición de su catabolismo podría resultar en un mantenimiento de los niveles elevados de NADA.

En resumen, este estudio ofrece un nuevo mecanismo de acción de las *N*-acil dopaminas con importantes consecuencias en la respuesta a hipoxia y control de la angiogénesis en el contexto del SNC. Demostramos como el NADA puede modular la actividad de SIAH2, afectando a la estabilidad de algunos de sus sustratos, incluyendo PHD3, HIPK2 y DYRK2. La inhibición de PHD3 afecta a la expresión del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , el cual promueve la expresión de genes como *EPO*, *VEGFA*, *HMOX1*, *HK2* y *BNIP3* que están implicados en la angiogénesis, neuroprotección y supervivencia celular. El potencial farmacológico de la modulación de las *N*-acil dopaminas abre la puerta al desarrollo de nuevas terapias con importantes aplicaciones en la prevención de procesos como la isquemia cerebral y enfermedades neurodegenerativas.



*CONCLUSIONES*

---





### **VIII.- CONCLUSIONES.**

1.- Las *N*-acil dopaminas, a través de su grupo dopamina, median la estabilización de HIF-1 $\alpha$  a través de mecanismos independientes de receptor.

2.- El NADA es capaz de estabilizar a HIF-1 $\alpha$  e incrementar su vida media.

3.- NADA induce la degradación de PHD3 a través de la activación de SIAH2.

4.- NADA incrementa la actividad de SIAH2 sin afectar a su dimerización, fosforilación ni regulación a través de la ruta AKT.

5.- NADA incrementa la expresión de genes neuroprotectores e involucrados en la angiogénesis, aumentando esta última y protegiendo a las células frente a la muerte provocada por hipoxia.



## *BIBLIOGRAFÍA*

---



**IX.- BIBLIOGRAFÍA.**

Ahmed AU, Schmidt RL, Park CH, Reed NR, Hesse SE, Thomas CF, Molina JR, Deschamps C, Yang P, Aubry MC (2008) Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth. *Journal of the National Cancer Institute* **100**: 1606-1629

Aimee YY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester J (1999) Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *The Journal of clinical investigation* **103**: 691-696

Akimov M, Gretskaya N, Shevchenko K, Shevchenko V, Myasoedov N, Bobrov MY, Bezuglov V (2007) New aspects of biosynthesis and metabolism of N-acyldopamines in rat tissues. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **33**: 602-606

Akimov M, Nazimov I, Gretskaya N, Zinchenko G, Bezuglov V (2009) Sulfation of N-acyl dopamines in rat tissues. *Biochemistry (Moscow)* **74**: 681-685

Almli CR, Levy TJ, Han BH, Shah AR, Gidday JM, Holtzman DM (2000) BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental neurology* **166**: 99-114

Aragonés J, Fraisl P, Baes M, Carmeliet P (2009) Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell metabolism* **9**: 11-22

Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proceedings of the national academy of sciences* **93**: 12969-12973

Bae M-K, Ahn M-Y, Jeong J-W, Bae M-H, Lee YM, Bae S-K, Park J-W, Kim K-R, Kim K-W (2002) Jab1 interacts directly with HIF-1 $\alpha$  and regulates its stability. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 9-12

Behling KC, Tang A, Freydin B, Chervoneva I, Kadakia S, Schwartz GF, Rui H, Witkiewicz AK (2011) Increased SIAH expression predicts ductal carcinoma in situ (DCIS) progression to invasive carcinoma. *Breast cancer research and treatment* **129**: 717-724

Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A (2002) Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circulation research* **90**: 784-791

Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR (2000) Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Annals of neurology* **48**: 285-296

Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR (1999) Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *European Journal of Neuroscience* **11**: 4159-4170

Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Viñals F, Gothié E, Roux D, Pagès G, Pouysségur J (2000) Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochemical pharmacology* **60**: 1171-1178

Berra E, Roux D, Richard DE, Pouysségur J (2001) Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) escapes O<sub>2</sub>-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO reports* **2**: 615-620

Bezuglov V, Bobrov M, Gretskaya N, Gonchar A, Zinchenko G, Melck D, Bisogno T, Di Marzo V, Kuklev D, Rossi J-C (2001) Synthesis and biological evaluation of novel amides of polyunsaturated fatty acids with dopamine. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **11**: 447-449

Bhanot M, Smith S (2012) TIN2 stability is regulated by the E3 ligase Siah2. *Molecular and cellular biology* **32**: 376-384

Bianchi L, Tacchini L, Cairo G (1999) HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic acids research* **27**: 4223-4227

Bisogno T, Melck D, Bobrov M, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V (2000) N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J* **351 Pt 3**: 817-824

Biswas KK, Sarker KP, Abeyama K, Kawahara Ki, Iino S, Otsubo Y, Saigo K, Izumi H, Hashiguchi T, Yamakuchi M (2003) Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis. *Hepatology* **38**: 1167-1177

Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chemistry & biology* **14**: 1347-1356

Bona E, Hagberg H, Løberg EM, Bågenholm R, Thoresen M (1998) Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short-and long-term outcome. *Pediatric research* **43**: 738-745

Bonifácio MJ, Palma PN, Almeida L, Soares-da-Silva P (2007) Catechol-O-methyltransferase and Its Inhibitors in Parkinson's Disease. *CNS drug reviews* **13**: 352-379

Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouysségur J (2005) Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  requires multiple posttranslational modifications. *Cellular signalling* **17**: 1-9

Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouysségur J (2007) Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current Opinion in Cell Biology* **19**: 223-229

Brown AJ, Robin Hiley C (2009) Is GPR55 an anandamide receptor? *Vitamins & Hormones* **81**: 111-137

- Bruick RK (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proceedings of the national academy of sciences* **97**: 9082-9087
- Bruick RK, McKnight SL (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**: 1337-1340
- Buchwald M, Pietschmann K, Brand P, Günther A, Mahajan N, Heinzel T, Krämer O (2012) SIAH ubiquitin ligases target the nonreceptor tyrosine kinase ACK1 for ubiquitinylation and proteasomal degradation. *Oncogene* **32**: 4913-4920
- Bunn HF, Poyton RO (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiological reviews* **76**: 839-885
- Calzado MA, de la Vega L, Moller A, Bowtell DD, Schmitz ML (2009) An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response. *Nat Cell Biol* **11**: 85-91
- Campbell NRC, Van Loon JA, Weinshilboum RM (1987) Human liver phenol sulfotransferase: Assay conditions, biochemical properties and partial purification of isozymes of the thermostable form. *Biochemical Pharmacology* **36**: 1435-1446
- Carlucci A, Adornetto A, Scorziello A, Viggiano D, Foca M, Cuomo O, Annunziato L, Gottesman M, Feliciello A (2008) Proteolysis of AKAP121 regulates mitochondrial activity during cellular hypoxia and brain ischaemia. *The EMBO journal* **27**: 1073-1084
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert J-M, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P (1998) Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**: 485-490
- Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Molecular and cellular biology* **20**: 402-415
- Carthew RW, Neufeld TP, Rubin GM (1994) Identification of genes that interact with the sina gene in Drosophila eye development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 11689-11693
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816-824
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research* **49**: 507-521
- Crews ST (1998) Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes & development* **12**: 607-620



Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1 Interaction between H-ras and hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 9519-9525

Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V (2003) N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 13633-13639

Dang CV, Semenza GL (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in biochemical sciences* **24**: 68-72

de la Vega L, Hornung J, Kremmer E, Milanovic M, Schmitz ML (2013) Homeodomain-interacting protein kinase 2-dependent repression of myogenic differentiation is relieved by its caspase-mediated cleavage. *Nucleic acids research* **41**: 5731-5745

Della NG, Senior PV, Bowtell D (1993) Isolation and characterisation of murine homologues of the Drosophila seven in absentia gene (sina). *Development* **117**: 1333-1343

Depaux A, Regnier-Ricard F, Germani A, Varin-Blank N (2006) Dimerization of hSiah proteins regulates their stability. *Biochemical and biophysical research communications* **348**: 857-863

Devane WA, Dysarz Fr, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology* **34**: 605-613

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**: 1946-1949

Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N, Buono A (1996) Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J* **316**: 977-984

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz J-C, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.

Ebert BL, Bunn HF (1998) Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Molecular and cellular biology* **18**: 4089-4096

Eckhart AD, Yang N, Xin X, Faber JE (1997) Characterization of the  $\alpha$ 1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proceedings of the national academy of sciences* **94**: 9487-9492

Eisenhofer G, Coughtrie MW, Goldstein DS (1999) Dopamine sulphate: an enigma resolved. *Clinical and experimental pharmacology & physiology Supplement* **26**: S41-53

- Eklind S, Mallard C, Arvidsson P, Hagberg H (2005) Lipopolysaccharide induces both a primary and a secondary phase of sensitization in the developing rat brain. *Pediatric research* **58**: 112-116
- Eldrup E (2004) Significance and origin of DOPA, DOPAC, and dopamine-sulphate in plasma, tissues and cerebrospinal fluid. *Dan Med Bull* **51**: 34-62
- Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R, Arbeit JM (2000) Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer research* **60**: 6189-6195
- Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 $\alpha$  in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *The EMBO journal* **18**: 1905-1914
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proceedings of the national academy of sciences* **94**: 4273-4278
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A (2001) *C. elegans* EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation. *Cell* **107**: 43-54
- Famulski JK, Trivedi N, Howell D, Yang Y, Tong Y, Gilbertson R, Solecki DJ (2010) Siah regulation of Pard3A controls neuronal cell adhesion during germinal zone exit. *Science* **330**: 1834-1838
- Fanelli M, Fantozzi A, De Luca P, Caprodossi S, Matsuzawa S-i, Lazar MA, Pelicci PG, Minucci S (2004) The coiled-coil domain is the structural determinant for mammalian homologues of Drosophila Sina-mediated degradation of promyelocytic leukemia protein and other tripartite motif proteins by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 5374-5379
- Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer research* **59**: 3915-3918
- Fiucci G, Beaucourt S, Duflaut D, Lespagnol A, Stumptner-Cuvelette P, Géant A, Buchwalter G, Tuynder M, Susini L, Lassalle J-M (2004) Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3510-3515
- Forsythe JA, Jiang B-H, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology* **16**: 4604-4613

Frasor J, Danes JM, Funk CC, Katzenellenbogen BS (2005) Estrogen down-regulation of the corepressor N-CoR: mechanism and implications for estrogen derepression of N-CoR-regulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 13153-13157

Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DE, Lagerström MC, Schiöth HB (2003) Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS letters* **554**: 381-388

Frew IJ, Hammond VE, Dickins RA, Quinn JM, Walkley CR, Sims NA, Schnall R, Della NG, Holloway AJ, Digby MR (2003) Generation and analysis of Siah2 mutant mice. *Molecular and cellular biology* **23**: 9150-9161

Fürstenberger G, Krieg P, Müller-Decker K, Habenicht A (2006) What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? *International journal of cancer* **119**: 2247-2254

Gasperi V, Fezza F, Pasquariello N, Bari M, Oddi S, Agrò AF, Maccarrone M (2007) Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cellular and molecular life sciences* **64**: 219-229

Gidday JM (2006) Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nature Reviews Neuroscience* **7**: 437-448

Giordano FJ, Johnson RS (2001) Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Current opinion in genetics & development* **11**: 35-40

Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF (1988) Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* **242**: 1412-1415

Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, Remé CE (2002) HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nature medicine* **8**: 718-724

Grishina I, Debus K, Garcia-Limones C, Schneider C, Shresta A, Garcia C, Calzado MA, Schmitz ML (2012) SIAH-mediated ubiquitination and degradation of acetyl-transferases regulate the p53 response and protein acetylation. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 2287-2296

Groulx I, Lee S (2002) Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Molecular and cellular biology* **22**: 5319-5336

Gu Y-Z, Moran S, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA (1997) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene expression* **7**: 205-213

- Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG (2006) A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* **441**: 646-650
- Habelhah H, Frew IJ, Laine A, Janes PW, Relaix F, Sassoon D, Bowtell DD, Ronai Ze (2002) Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *The EMBO journal* **21**: 5756-5765
- Habelhah H, Laine A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Gershwin ME, Bowtell DD, Ronai Ze (2004) Regulation of 2-oxoglutarate ( $\alpha$ -ketoglutarate) dehydrogenase stability by the RING finger ubiquitin ligase Siah. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 53782-53788
- Hanuš L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 3662-3665
- Harari OA, Liao JK (2010) NF- $\kappa$ B and innate immunity in ischemic stroke. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1207**: 32-40
- Harrison S, De Petrocellis L, Trevisani M, Benvenuti F, Bifulco M, Geppetti P, Di Marzo V (2003) Capsaicin-like effects of *N*-arachidonoyl-dopamine in the isolated guinea pig bronchi and urinary bladder. *European journal of pharmacology* **475**: 107-114
- Harten SK, Ashcroft M, Maxwell PH (2010) Prolyl hydroxylase domain inhibitors: a route to HIF activation and neuroprotection. *Antioxidants & redox signaling* **12**: 459-480
- Hellwig-Bürgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W (2005) Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *Journal of interferon & cytokine research* **25**: 297-310
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of neuroscience* **11**: 563-583
- Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian Y-M, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM (2002) Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 26351-26355
- Hillard C, Harris R, Bloom A (1985) Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **232**: 579-588
- Hollander AP, Corke KP, Freemont AJ, Lewis CE (2001) Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by macrophages in the rheumatoid synovium: Implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis & Rheumatism* **44**: 1540-1544

Holloway AJ, Della NG, Fletcher CF, Largespada DA, Copeland NG, Jenkins NA, Bowtell DD (1997) Chromosomal Mapping of Five Highly Conserved Murine Homologues of the *Drosophila* RING Finger Gene *Seven-in-absentia*. *Genomics* **41**: 160-168

Hon W-C, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY (2002) Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 $\alpha$  by pVHL. *Nature* **417**: 975-978

House CM, Hancock NC, Möller A, Cromer BA, Fedorov V, Bowtell DD, Parker MW, Polekhina G (2006) Elucidation of the substrate binding site of Siah ubiquitin ligase. *Structure* **14**: 695-701

House CM, Möller A, Bowtell DD (2009) Siah proteins: novel drug targets in the Ras and hypoxia pathways. *Cancer research* **69**: 8835-8838

Hu G, Chung Y-L, Glover T, Valentine V, Look AT, Fearon ER (1997a) Characterization of Human Homologs of the *Drosophila seven in absentia (sina)* Gene. *Genomics* **46**: 103-111

Hu G, Fearon ER (1999) Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins. *Molecular and cellular biology* **19**: 724-732

Hu G, Zhang S, Vidal M, La Baer J, Xu T, Fearon ER (1997b) Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin–proteasome pathway. *Genes & development* **11**: 2701-2714

Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA (1998) Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochemical and biophysical research communications* **245**: 894-899

Hu SS, Bradshaw HB, Benton VM, Chen JS, Huang SM, Minassi A, Bisogno T, Masuda K, Tan B, Roskoski R, Jr., Cravatt BF, Di Marzo V, Walker JM (2009) The biosynthesis of N-arachidonoyl dopamine (NADA), a putative endocannabinoid and endovanilloid, via conjugation of arachidonic acid with dopamine. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **81**: 291-301

Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS (2002a) Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 39792-39800

Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its  $\alpha$  subunit. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 32253-32259

Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ (2002b) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 8400-8405

Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Goldberg MA (1996) Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proceedings of the national academy of sciences* **93**: 10595-10599

Ivan M, Kaelin Jr WG (2001) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Current opinion in genetics & development* **11**: 27-34

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Aimee YY (1998) Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes & development* **12**: 149-162

Izzo AA, Sharkey KA (2010) Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacology & Therapeutics* **126**: 21-38

Jaakkola P, Mole DR, Tian Y-M, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ (2001) Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**: 468-472

Ji TH, Grossmann M, Ji I (1998) G protein-coupled receptors I. Diversity of receptor-ligand interactions. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 17299-17302

Jiang B-H, Agani F, Passaniti A, Semenza GL (1997) V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer research* **57**: 5328-5335

Jones NM, Kardashyan L, Callaway JK, Lee EM, Beart PM (2008) Long-term functional and protective actions of preconditioning with hypoxia, cobalt chloride, and desferrioxamine against hypoxic-ischemic injury in neonatal rats. *Pediatric research* **63**: 620-624

Jonsson KO, Holt S, Fowler CJ (2006) The endocannabinoid system: current pharmacological research and therapeutic possibilities. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **98**: 124-134

Joško J, Gwóźdź B, Jedrzejowska-Szypułka H, Hendryk S (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit* **6**: 1047-1052

Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L (1997) Activation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : Posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proceedings of the national academy of sciences* **94**: 5667-5672

Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW (2000) Activation of HIF1 $\alpha$  ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proceedings of the national academy of sciences* **97**: 10430-10435

Khurana A, Nakayama K, Williams S, Davis RJ, Mustelin T, Ronai Ze (2006) Regulation of the ring finger E3 ligase Siah2 by p38 MAPK. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 35316-35326

Kietzmann T, Roth U, Jungermann K (1999) Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* **94**: 4177-4185

Kilroy G, Kirk-Ballard H, Carter LE, Floyd ZE (2012) The ubiquitin ligase Siah2 regulates PPAR $\gamma$  activity in adipocytes. *Endocrinology* **153**: 1206-1218

Kim H, Scimia MC, Wilkinson D, Trelles RD, Wood MR, Bowtell D, Dillin A, Mercola M, Ronai ZeA (2011) Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia. *Molecular cell* **44**: 532-544

Kline DD, Peng Y-J, Manalo DJ, Semenza GL, Prabhakar NR (2002) Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Proceedings of the national academy of sciences* **99**: 821-826

Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P, Semenza GL, Sitkovsky MV (2002) Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ -deficient chimeric mice. *Proceedings of the national academy of sciences* **99**: 2170-2174

Kozak K, Marnett L (2002) Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids* **66**: 211-220

Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer research* **63**: 1138-1143

Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science* **295**: 858-861

Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and cellular biology* **21**: 3995-4004

Lee PJ, Jiang B-H, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM (1997) Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 5375-5381

Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA (2000) Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *New England Journal of Medicine* **342**: 626-633

Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA (1995) Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 13333-13340

Li S, Li Y, Carthew RW, Lai Z-C (1997) Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack. *Cell* **90**: 469-478

- Li S, Xu C, Carthew RW (2002) Phyllopod acts as an adaptor protein to link the sine ubiquitin ligase to the substrate protein tramtrack. *Molecular and cellular biology* **22**: 6854-6865
- Liani E, Eyal A, Avraham E, Shemer R, Szargel R, Berg D, Bornemann A, Riess O, Ross CA, Rott R (2004) Ubiquitylation of synphilin-1 and  $\alpha$ -synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy bodies imply a role in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 5500-5505
- Liao Y, Zhang M, Lönnnerdal B (2013) Growth factor TGF- $\beta$  induces intestinal epithelial cell (IEC-6) differentiation: miR-146b as a regulatory component in the negative feedback loop. *Genes & nutrition* **8**: 69-78
- Lok CN, Ponka P (1999) Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 24147-24152
- Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, Oldfield EH (2003) von Hippel-Lindau disease. *The Lancet* **361**: 2059-2067
- Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM (1999) RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 11364-11369
- Lu H, Forbes RA, Verma A (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 23111-23115
- MacLeod RJ, Hayes M, Pacheco I (2007) Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **293**: G403-G411
- Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* **414**: 550-554
- Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L (2002) Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 $\alpha$  locus. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 32405-32408
- Maltepe E, Saugstad OD (2009) Oxygen in health and disease: regulation of oxygen homeostasis-clinical implications. *Pediatric research* **65**: 261-268
- Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC (1997) Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* **386**: 403-407
- Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Shui QY, Garcia JG, Semenza GL (2005) Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* **105**: 659-669



Marinelli S, Di Marzo V, Berretta N, Matias I, Maccarrone M, Bernardi G, Mercuri NB (2003) Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *The Journal of neuroscience* **23**: 3136-3144

Marrs WR, Blankman JL, Horne EA, Thomazeau A, Lin YH, Coy J, Bodor AL, Muccioli GG, Hu SS-J, Woodruff G (2010) The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nature neuroscience* **13**: 951-957

Martin C, Yu AY, Jiang B-H, Davis L, Kimberly D, Hohimer AR, Semenza GL (1998) Cardiac hypertrophy in chronically anemic fetal sheep: increased vascularization is associated with increased myocardial expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1. *American journal of obstetrics and gynecology* **178**: 527-534

Marzo V, Petrocellis LD (2010) Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: a further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. *Current medicinal chemistry* **17**: 1430-1449

Masson N, Ratcliffe PJ (2003) HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O<sub>2</sub> levels. *Journal of cell science* **116**: 3041-3049

Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. *The EMBO journal* **20**: 5197-5206

Matas D, Juknat A, Pietr M, Klin Y, Vogel Z (2007) Anandamide protects from low serum-induced apoptosis via its degradation to ethanolamine. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 7885-7892

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**: 561-564

Matsuzawa S-i, Reed JC (2001) Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for  $\beta$ -catenin degradation linked to p53 responses. *Molecular cell* **7**: 915-926

Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M (2003) Multiple splice variants of the human HIF-3 $\alpha$  locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 11032-11040

McFarland MJ, Barker EL (2004) Anandamide transport. *Pharmacology & Therapeutics* **104**: 117-135

Mechoulam R (1970) Marijuana chemistry. *Science* **168**: 1159-1165

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology* **50**: 83-90

- Mechoulam R, Gaoni Y (1965) A Total Synthesis of dl- $\Delta^1$ -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish<sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society* **87**: 3273-3275
- Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L (1995) A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *The Journal of experimental medicine* **182**: 1683-1693
- Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W (2003) Intracellular localisation of human HIF-1 $\alpha$  hydroxylases: implications for oxygen sensing. *Journal of cell science* **116**: 1319-1326
- Min J-H, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Pavletich NP (2002) Structure of an HIF-1 $\alpha$ -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* **296**: 1886-1889
- Möller A, House CM, Wong CS, Scanlon DB, Liu MC, Ronai Ze, Bowtell DD (2008) Inhibition of Siah ubiquitin ligase function. *Oncogene* **28**: 289-296
- Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL (2000) Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 21048-21054
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.
- Nadeau RJ, Toher JL, Yang X, Kovalenko D, Friesel R (2007) Regulation of Sprouty2 stability by mammalian Seven-in-Absentia homolog 2. *Journal of cellular biochemistry* **100**: 151-160
- Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoumik A, Kadoya T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Frappell PB (2004) Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 $\alpha$  abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* **117**: 941-952
- Nakayama K, Qi J, Ronai Ze (2009) The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response. *Molecular Cancer Research* **7**: 443-451
- Nakayama K, Ronai Ze (2004) Siah: new players in the cellular response to hypoxia. *Cell Cycle* **3**: 1345-1347
- Navarrete CM, Fiebich BL, De Vinuesa AG, Hess S, De Oliveira ACP, Candelario-Jalil E, Caballero FJ, Calzado MA, Muñoz E (2009) Opposite effects of anandamide and n-arachidonoyl dopamine in the regulation of prostaglandin E2 and 8-iso-PGF2 $\alpha$  formation in primary glial cells. *Journal of Neurochemistry* **109**: 452-464
- Navarrete CM, Pérez M, de Vinuesa AG, Collado JA, Fiebich BL, Calzado MA, Muñoz E (2010) Endogenous N-acyl-dopamines induce COX-2 expression in brain endothelial cells by stabilizing mRNA through a p38 dependent pathway. *Biochemical Pharmacology* **79**: 1805-1814

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal* **13**: 9-22

Nguyen SV, Claycomb WC (1999) Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **265**: 382-386

O'Sullivan SE, Kendall DA, Randall MD (2004) Characterisation of the vasorelaxant properties of the novel endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine (NADA). *British journal of pharmacology* **141**: 803-812

Ota A, Ikeda T, Xia XY, Xia YX, Ikenoue T (2000) Hypoxic-ischemic tolerance induced by hyperthermic pretreatment in newborn rats. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* **7**: 102-105

Overton H, Fyfe M, Reynet C (2008) GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity. *British journal of pharmacology* **153**: S76-S81

Ozaki H, Yu A, Della N, Ozaki K, Luna J, Yamada H, Hackett S, Okamoto N, Zack D, Semenza G (1999) Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Investigative ophthalmology & visual science* **40**: 182-189

Pagano C, Rossato M, Vettor R (2008) Endocannabinoids, adipose tissue and lipid metabolism. *Journal of neuroendocrinology* **20**: 124-129

Pajouhesh H, Hancock AJ (1984) Synthesis of cyclopentano-N-methylphosphatidylethanolamines: aminolysis during the use of methylamine. *Journal of lipid research* **25**: 310-312

Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong G-H (2000) The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  plays an important role in vascular remodeling. *Proceedings of the national academy of sciences* **97**: 8386-8391

Pérez M, García-Limones C, Zapico I, Marina A, Schmitz ML, Muñoz E, Calzado MA (2012) Mutual regulation between SIAH2 and DYRK2 controls hypoxic and genotoxic signaling pathways. *Journal of molecular cell biology*: mjs047

Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & Therapeutics* **74**: 129-180

Pertwee RG (2005) Pharmacological actions of cannabinoids. In *Cannabinoids*, pp 1-51. Springer

Piomelli D, Greengard P (1990) Lipoygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signalling. *Trends in pharmacological sciences* **11**: 367-373

Polekhina G, House CM, Traficante N, Mackay JP, Relaix F, Sassoon DA, Parker MW, Bowtell DD (2001) Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF- $\alpha$  signaling. *Nature Structural & Molecular Biology* **9**: 68-75

Porter AC, Sauer J-M, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **301**: 1020-1024

Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**: 437-443

Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the  $\alpha$  subunit. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 11205-11214

Qi J, Nakayama K, Gaitonde S, Goydos JS, Krajewski S, Eroshkin A, Bar-Sagi D, Bowtell D, Ronai Ze (2008) The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and-independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 16713-16718

Qi J, Pellecchia M, Ze'ev AR (2010) The Siah2-HIF-FoxA2 axis in prostate cancer—new markers and therapeutic opportunities. *Oncotarget* **1**: 379

Rabinowitz MH (2013) Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Domain Oxygen Sensors: Tricking the Body into Mounting Orchestrated Survival and Repair Responses.

Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Harger G, Conrad K (2003) Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1 $\alpha$  and-2 $\alpha$  proteins in pre-eclamptic placentae. *Placenta* **24**: 199-208

Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes & development* **14**: 34-44

Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH (1997) Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 20055-20062

Ross RA (2009) The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends in pharmacological sciences* **30**: 156-163

Ruas JL, Poellinger L, Pereira T (2002) Functional Analysis of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ -mediated Transactivation: IDENTIFICATION OF AMINO ACID RESIDUES CRITICAL FOR TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION AND/OR INTERACTION WITH CREB-BINDING PROTEIN. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 38723-38730

Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998) HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *The EMBO journal* **17**: 3005-3015

Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions ITS STABILIZATION BY HYPOXIA DEPENDS ON REDOX-INDUCED CHANGES. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 22642-22647

Sancho R, de la Vega L, Macho A, Appendino G, Di Marzo V, Muñoz E (2005) Mechanisms of HIV-1 inhibition by the lipid mediator N-arachidonoyldopamine. *The Journal of Immunology* **175**: 3990-3999

Sancho R, Macho A, de La Vega L, Calzado MA, Fiebich BL, Appendino G, Muñoz E (2004) Immunosuppressive activity of endovanilloids: N-arachidonoyl-dopamine inhibits activation of the NF- $\kappa$ B, NFAT, and activator protein 1 signaling pathways. *The Journal of Immunology* **172**: 2341-2351

Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, Caro J (2002) Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Molecular and cellular biology* **22**: 2984-2992

Sarkar TR, Sharan S, Wang J, Pawar SA, Cantwell CA, Johnson PF, Morrison DK, Wang J-M, Sterneck E (2012) Identification of a Src tyrosine kinase/SIAH2 E3 ubiquitin ligase pathway that regulates C/EBP $\delta$  expression and contributes to transformation of breast tumor cells. *Molecular and cellular biology* **32**: 320-332

Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52,  $\Psi$ GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Molecular brain research* **64**: 193-198

Scortegagna M, Subtil T, Qi J, Kim H, Zhao W, Gu W, Kluger H, Ze'ev AR (2011) USP13 enzyme regulates Siah2 ligase stability and activity via noncatalytic ubiquitin-binding domains. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 27333-27341

Schmidt RL, Park CH, Ahmed AU, Gundelach JH, Reed NR, Cheng S, Knudsen BE, Tang AH (2007) Inhibition of RAS-mediated transformation and tumorigenesis by targeting the downstream E3 ubiquitin ligase seven in absentia homologue. *Cancer research* **67**: 11798-11810

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols* **3**: 1101-1108

Schnell JD, Hicke L (2003) Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 35857-35860

Schuler M, Green D (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions* **29**: 684-687

- Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS (2001) Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* **21**: 3436-3444
- Seah VM, Wong KP (1994) 2, 6-Dichloro-4-nitrophenol (DCNP), an alternate-substrate inhibitor of phenolsulfotransferase. *Biochemical Pharmacology* **47**: 1743-1749
- Semenza GL (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Current opinion in genetics & development* **8**: 588-594
- Semenza GL (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in Molecular Medicine* **7**: 345-350
- Semenza GL (2002) Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* **41**: 79-83
- Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **3**: 721-732
- Semenza GL (2009) Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology* **24**: 97-106
- Semenza GL, Neufelt MK, Chi SM, Antonarakis SE (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3'to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the national academy of sciences* **88**: 5680-5684
- Shah M, Stebbins JL, Dewing A, Qi J, Pellecchia M, Ronai ZeA (2009) Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis. *Pigment cell & melanoma research* **22**: 799-808
- Simon RP, Niirio M, Gwinn R (1993) Prior ischemic stress protects against experimental stroke. *Neuroscience letters* **163**: 135-137
- Skaper SD, Facci L (2012) Mast cell–glia axis in neuroinflammation and therapeutic potential of the anandamide congener palmitoylethanolamide. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 3312-3325
- Speer RE, Karuppagounder SS, Basso M, Sleiman SF, Kumar A, Brand D, Smirnova N, Gazaryan I, Khim SJ, Ratan RR (2013) Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases as targets for neuroprotection by “antioxidant” metal chelators: From ferroptosis to stroke. *Free Radical Biology and Medicine* **62**: 26-36
- Srinivas V, Zhang L-P, Zhu X-H, Caro J (1999) Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor  $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ) proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **260**: 557-561
- Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V (2007) Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacology & Therapeutics* **114**: 13-33

Stebbins JL, Santelli E, Feng Y, De SK, Purves A, Motamedchaboki K, Wu B, Ronai ZeA, Liddington RC, Pellecchia M (2013) Structure-Based Design of Covalent Siah Inhibitors. *Chemistry & biology* **20**: 973-982

Stetler RA, Leak RK, Gan Y, Li P, Zhang F, Hu X, Jing Z, Chen J, Zigmond MJ, Gao Y (2014) Preconditioning provides neuroprotection in models of CNS disease: Paradigms and clinical significance. *Progress in Neurobiology* **114**: 58-83

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and biophysical research communications* **215**: 89-97

Sun Y-Y, Wang C-Y, Hsu M-F, Juan S-H, Chang C-Y, Chou C-M, Yang L-Y, Hung K-S, Xu J, Lee Y-H (2010) Glucocorticoid Protection of Oligodendrocytes against Excitotoxin Involving Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in a Cell-Type-Specific Manner. *The Journal of neuroscience* **30**: 9621-9630

Szczepanowski M, Adam-Klages S, Kruse M-L, Pollmann M, Klapper W, Parwaresch R, Heidebrecht H-J (2007) Regulation of repp86 stability by human Siah2. *Biochemical and biophysical research communications* **362**: 485-490

Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G (1999) Transferrin receptor induction by hypoxia HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 24142-24146

Takahashi Y, Takahashi S, Shiga Y, Yoshimi T, Miura T (2000) Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase  $\alpha$  (I) in cultured cells. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 14139-14146

Talbot KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *The American journal of pathology* **157**: 411-421

Tang AH, Neufeld TP, Kwan E, Rubin GM (1997) PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell* **90**: 459-467

Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL (1998) The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes & development* **12**: 3320-3324

Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development* **11**: 72-82

Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y (2003) Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent  $\beta$ -catenin degradation. *The Journal of cell biology* **162**: 899-908

- Tsuboi K, Sun Y-X, Okamoto Y, Araki N, Tonai T, Ueda N (2005) Molecular characterization of N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 11082-11092
- Twomey E, Li Y, Lei J, Sodja C, Ribocco-Lutkiewicz M, Smith B, Fang H, Bani-Yaghoub M, McKinnell I, Sikorska M (2010) Regulation of MYPT1 stability by the E3 ubiquitin ligase SIAH2. *Experimental cell research* **316**: 68-77
- Volm M, Koomägi R (1999) Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer research* **20**: 1527-1533
- Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the national academy of sciences* **92**: 5510-5514
- Wenger RH (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *The FASEB Journal* **16**: 1151-1162
- Wiesener M, Turley H, Allen W, Willam C, Eckardt K-U, Talks K, Wood S, Gatter K, Harris A, Pugh C (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Blood* **92**: 2260-2268
- Winter M, Sombroek D, Dauth I, Moehlenbrink J, Scheuermann K, Crone J, Hofmann TG (2008) Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR. *Nature cell biology* **10**: 812-824
- Wojtalla A, Herweck F, Granzow M, Klein S, Trebicka J, Huss S, Lerner R, Lutz B, Schildberg FA, Knolle PA (2012) The endocannabinoid N-arachidonoyl dopamine (NADA) selectively induces oxidative stress-mediated cell death in hepatic stellate cells but not in hepatocytes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **302**: G873-G887
- Xie W, Jin L, Mei Y, Wu M (2009) E2F1 represses  $\beta$ -catenin/TCF activity by direct up-regulation of Siah1. *Journal of cellular and molecular medicine* **13**: 1719-1727
- Xu M, Yang L, Hong L-Z, Zhao X-Y, Zhang H-L (2012) Direct protection of neurons and astrocytes by matrine via inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway contributes to neuroprotection against focal cerebral ischemia. *Brain research* **1454**: 48-64
- Yamaguchi A, Taniguchi M, Hori O, Ogawa S, Tojo N, Matsuoka N, Miyake S-i, Kasai K, Sugimoto H, Tamatani M (2002) Peg3/Pw1 is involved in p53-mediated cell death pathway in brain ischemia/hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 623-629
- Yego ECK, Mohr S (2010) siah-1 Protein is necessary for high glucose-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase nuclear accumulation and cell death in Müller cells. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 3181-3190



Yun S, Möller A, Chae S-K, Hong W-P, Bae YJ, Bowtell DD, Ryu SH, Suh P-G (2008) Siah Proteins Induce the Epidermal Growth Factor-dependent Degradation of Phospholipase C $\epsilon$ . *Journal of Biological Chemistry* **283**: 1034-1042

Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ (2002) Inhibition of *PPAR $\gamma$ 2* Gene Expression by the HIF-1-Regulated Gene *DEC1/Stra13*: A Mechanism for Regulation of Adipogenesis by Hypoxia. *Developmental cell* **2**: 331-341

Zhang J, Guenther MG, Carthew RW, Lazar MA (1998) Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes & development* **12**: 1775-1780

Zhao H-L, Ueki N, Hayman MJ (2010) The Ski protein negatively regulates Siah2-mediated HDAC3 degradation. *Biochemical and biophysical research communications* **399**: 623-628

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer research* **59**: 5830-5835

*ANEXOS*

---



**X.- ANEXOS.**

**1.- Publicación derivada de la tesis doctoral.**





## Hypoximimetic activity of *N*-acyl-dopamines. *N*-arachidonoyl-dopamine stabilizes HIF-1 $\alpha$ protein through a SIAH2-dependent pathway



Rafael Soler-Torronteras, Maribel Lara-Chica, Victor García, Marco A. Calzado\*, Eduardo Muñoz\*

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)/ Hospital Universitario Reina Sofía/ Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 March 2014

Received in revised form 11 July 2014

Accepted 15 July 2014

Available online 2 August 2014

#### Keywords:

Endogenous lipid mediator

Signal transduction

Hypoxia

Neuroprotection

### ABSTRACT

The *N*-acyl conjugates of amino acids and neurotransmitters (NAANs) are a class of endogenous lipid messengers that are expressed in the mammalian central and peripheral nervous system. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is a transcription factor that plays a key role in the cellular adaptation to hypoxia and ischemia, and hypoxic preconditioning through HIF-1 $\alpha$  has been shown to be neuroprotective in ischemic models. This study showed that *N*-acyl-dopamines induce HIF-1 $\alpha$  stabilization on human primary astrocytes and neurons as well as in transformed cell lines. *N*-arachidonoyl-dopamine (NADA)-induced HIF-1 $\alpha$  stabilization depends on the dopamine moiety of the molecule and is independent of cannabinoid receptor-1 (CB<sub>1</sub>) and transient receptor potential vanilloid type I (TRPV1) activation. NADA increases the activity of the E3 ubiquitin ligase seven in absentia homolog-2 (SIAH2), inhibits prolyl-hydroxylase-3 (PHD3) and stabilizes HIF-1 $\alpha$ . NADA enhances angiogenesis in endothelial vascular cells and promotes the expression of genes such as erythropoietin (EPO), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), heme oxygenase 1 (HMOX-1), hexokinase 2 (HK2) and Bcl-2/E1B-nineteen kiloDalton interacting protein (BNIP3) in primary astrocytes. These findings indicate a link between *N*-acyl-dopamines and hypoxic preconditioning and suggest that modulation of the *N*-acyl-dopamine metabolism might prove useful for prevention against hypoxic diseases.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The *N*-acyl conjugates of amino acids and neurotransmitters (NAANs) include compounds such as glycine, GABA or dopamine conjugated with long chain fatty acids. A large number of endogenous NAANs have been reported although their physiological role remains largely unknown [1]. Among them *N*-arachidonoyl-dopamine (NADA) and *N*-oleyl-dopamine (OLDA) have attracted special interest because they have been identified in brain homogenates and target receptors of the endocannabinoid system [2]. While NADA binds to cannabinoid type 1 receptor (CB<sub>1</sub>) and the transient receptor potential vanilloid

type 1 channel (TRPV-1) [2–4], OLDA is a capsaicin-like lipid with full TRPV-1 agonist activity but devoid of affinity for CB receptors [5].

NADA has been identified in the striatum, hippocampus, cerebellum and the dorsal root ganglion and is proposed to play a role in neuronal pain and inflammation [2]. In different experimental models it has been shown that NADA is a pleiotropic endocannabinoid/endovanilloid that exerts biological activities through mechanisms that are dependent and independent of CB<sub>1</sub> and TRPV-1 receptors. NADA had anandamide (AEA)-like activity in mice, producing the classic tetrad of behavioral signs characteristic of cannabinoid agonists such as increased immobility in the ring test, decreased body temperature, reduced locomotor activity and delayed response to a thermal stimulus [4]. In addition NADA induces hyperalgesia [2], smooth muscle contraction in the guinea pig bronchi and bladder [6], vasorelaxation in blood vessels [7], oxidative stress and apoptosis in hepatic stellate cells [8] and also has anti-HIV-1, neuroprotective and antiinflammatory properties [9–13]. Their saturated analogs *N*-palmitoyl-dopamine (PALDA) and *N*-stearoyl-dopamine (STEARDA) were also identified as endogenous substances not activating TRPV-1, although they significantly enhanced the TRPV-1-mediated effects of NADA [5].

Endocannabinoids as well as other NAANs may play a major role in neuroprotection by regulating the cellular network of communication between the nervous and immune system during neuroinflammation and neuronal damage [14]. However, the exact mechanisms by which

**Abbreviations:** AEA, *N*-arachidonoyl-ethanolamide; BNIP3, Bcl-2/E1B-nineteen kiloDalton interacting protein; CB<sub>1</sub>, cannabinoid receptor-1; EPO, erythropoietin; HBMECs, human brain microvascular endothelial cells; HUVECs, human umbilical vein endothelial cells; HIF, hypoxia inducing factor; HK2, hexokinase 2; HMOX-1, heme oxygenase 1; NADA, *N*-arachidonoyl-dopamine; NAANs, *N*-acyl conjugates of amino acids and neurotransmitters; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; PALDA, *N*-palmitoyl-dopamine; OLDA, *N*-oleyl-dopamine; PHD3, prolyl-hydroxylase-3; SIAH2, seven in absentia homolog-2; STEARDA, *N*-stearoyl-dopamine; TRPV1, transient receptor potential vanilloid; VEGFA, vascular endothelial growth factor A

\* Corresponding authors at: Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, C/María Virgen y Madre s/n., 14004 Córdoba, Spain. Tel.: +34 957218267; fax: +34 957218266.

E-mail addresses: [mcalzado@uco.es](mailto:mcalzado@uco.es) (M.A. Calzado), [e.munoz@uco.es](mailto:e.munoz@uco.es) (E. Muñoz).

different endocannabinoids and NAANs provide neuroprotection are far to be understood.

Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 mediates the endogenous adaptive program to hypoxia, and manipulation of components of the HIF-1 pathway results in neuroprotection in different experimental models [15]. Therefore the development of novel compounds with hypoximimetic activity is of interest for the treatment of hypoxic CNS diseases. In the context of deprivation of oxygen, cells adapt through up-regulation of the HIF-1 $\alpha$  protein, which, together with HIF-1 $\beta$  forms the transcription factor HIF-1 [16,17]. Under normoxic conditions, HIF-1 $\alpha$  levels are controlled by hydroxylation on proline 402 and 564 mediated by prolyl-hydroxylases (PHDs), which function as oxygen sensors [18]. The hydroxylated HIF-1 $\alpha$  increased its affinity for the tumor-suppressor protein von Hippel–Lindau (VHL), a component of an E3 ubiquitin ligase complex together with elongin B, C and cullin [19–21]. This complex mediates poly-ubiquitination of HIF-1 $\alpha$ , which causes its degradation by the 26S proteasome [22]. On the other hand, under hypoxic conditions HIF-1 $\alpha$  hydroxylation is decreased because reduced steady state levels of PHDs, which is controlled by SIAH (seven in absentia homolog) proteins by poly-ubiquitination and proteosomal degradation [23]. Low levels of oxygen cause the association between PHD3 and SIAH2, which favors the incorporation of other PHDs, resulting in the degradation of these enzymes and subsequent HIF-1 $\alpha$  stabilization. In summary, SIAH2 plays a key role in the regulation of hypoxia response by modulating HIF-1 $\alpha$  stability. This role was confirmed by the analysis of *Siah2*<sup>-/-</sup> mice, which show a blunted response to hypoxia [23]. Similarly, the interference of SIAH2/PHD binding reduces hypoxia-mediated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  and impairs neoangiogenesis in a syngeneic mouse model [24].

The SIAH protein family belongs to the RING (Really Interesting New Gene) finger E3 ubiquitin ligases, which in humans is formed by two subunits (SIAH1 and SIAH2) with similar and redundant functions encoded by different genes [25–28]. SIAH2 is responsible for ubiquitination and proteosomal degradation of specific substrates, interacting with them either directly or through adapter proteins [29–32]. SIAH2 substrates are involved in important signaling pathways that have been described, such as PHDs, PML, HDAC3,  $\beta$ -catenin, HIPK2 and DYRK2 [23,29,31,33–35]. SIAH2 expression and activity could be regulated at different levels. It has been described that SIAH2 levels are modulated at the transcriptional level by estrogens [17] and in response to transcription factors such as WNT5a and E2F1 [36,37]. In the same sense, the small noncoding microRNA MiR-146b targets the SIAH2 mRNA for degradation in response to TGF $\beta$  signaling [38]. At the protein level, different post-translational modifications have been described for SIAH2, its capacity to control their availability and activity by autoubiquitination being the most relevant under normal physiological conditions [39]. Under stress conditions, SIAH2 levels could be modulated by phosphorylation performed by upstream kinases. For instance, SIAH2 is phosphorylated by p38 MAPK, increasing its ability to degrade PHD3 [40]. Moreover, we have previously showed that two members of the dual-specificity tyrosine-regulated kinase (DYRK) family, HIPK2 and DYRK2, induce a strong phosphorylation of SIAH2 modifying its activity [29,35]. Several peptides able to modify SIAH2 activity have been described [24,41]. However, vitamin K3 (menadione) is to date the only chemical compound described able to affect SIAH2 levels and activity through a redox-independent mechanism [42].

The aims of this study were to determine the capacity of *N*-acyl-dopamines and related lipids to regulate hypoxia-dependent mechanisms in neuronal and non-neuronal cells. Herein we show for the first time that *N*-acyl-dopamines mediate HIF-1 $\alpha$  stabilization through CB<sub>1</sub>- and TRPV-1-independent mechanisms. Moreover, we demonstrate that NADA specifically increases the activity of SIAH2 enhancing PHD3 degradation. As a consequence, NADA acts as a hypoximimetic agent, regulating a large number of genes involved

in the hypoxia response and inducing angiogenesis in primary vascular endothelial cells. Our results provide new insights into the neuroprotective mechanisms of *N*-acyl-dopamines and open new research avenues for the development of novel therapeutic strategies for the management of CNS diseases.

## 2. Material and methods

### 2.1. Cell cultures

HEK-293T, HeLa, SK-N-SH, U87, MO3.13, control MEFs (mouse embryonic fibroblasts) and *Siah1a*<sup>-/-</sup>/*Siah2*<sup>-/-</sup> MEF cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% (v/v) penicillin/streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. HUVECs were maintained in medium 199 supplemented with 20% FBS, 2 mM penicillin/streptomycin (10,000 U and 10 mg/ml, respectively), 2 mM amphotericin B, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 30 mg/ml ECGS, and 100 mg/ml heparin. Primary cells were purchased from ScienCell (Carlsbad, CA, USA). Human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) were maintained in endothelial cell medium (ScienCell, P60104) supplemented with 5% FBS, 1% ECGS and 1% penicillin/streptomycin. Human astrocytes were maintained in astrocyte medium (ScienCell, P60101) supplemented with 2% FBS, 1% AGS and 1% penicillin/streptomycin solution. Human neurons from cortex were maintained in neuronal medium (ScienCell, P60157) supplemented with 1% NGS and 1% P/S solution. Hypoxia was induced by the culture of cells in a New Brunswick Galaxy 48R incubator at 1% O<sub>2</sub> concentration.

### 2.2. Transfection, plasmids and reagents

Transient transfections were carried out with Roti-Fect (Carl Roth) and harvested between 36 and 48 h after transfection. DNA amounts in each transfection were kept constant after the addition of empty expression vector. Flag-SIAH2, HA-SIAH2, Flag-SIAH2 RM (Ring Mutant, H98A/C101A), Flag-SIAH-5A (Ser16, Thr26, Ser28, Ser68, and Thr119 to alanine), Flag SIAH-5D (Ser16, Thr26, Ser28, Ser68, and Thr119 to aspartic acid) and HA-Ubiquitin were previously described [29,35]. Flag-PHD3 was a gift from Dr. Frank S. Lee (Pennsylvania School of Medicine) and Epo-Luc was a gift from Dr. M. L. Schmitz (Univ. of Giessen, Germany). *N*-arachidonoyl-dopamine (NADA), *N*-oleoyl-dopamine (OLDA), dopamine and cycloheximide were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). *N*-palmitoyl-dopamine (PALDA) and AM251 were from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). *N*-stearoyl-dopamine (STEARDA) was from Tocris Bioscience (Bristol, UK). *N*-arachidonoyl-L-tyrosine, *N*-arachidonoyl-ethanolamide (AEA), *N*-(4-hydroxyphenyl)-arachidonoyl ethanolamide (AM404), LY 294002 and MG-132 were from Enzo Life Science (Lausen, Switzerland). SB705498 was from Selleck Chemicals LCC (Houston, TX, USA). Hydroxytyrosol esters were a gift from Prof. Giovanni Appendino (UNIPMN, Novara, Italy). Scramble control oligonucleotide siRNA non-targeting pool (D-001810-10-20) and the siGENOME SMARTpool against SIAH2 (M-006561-02) were purchased from Dharmacon (Waltham, MA, USA).

### 2.3. Western blotting and antibodies

Protein soluble fractions were obtained by lysing the cells in 100  $\mu$ l of NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol and 1% NP-40) supplemented with 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin and aprotinin, and 1  $\mu$ l/ml PMSF saturated. After centrifugation the supernatants were mixed with SDS sample buffer and boiled at 95 °C. Proteins were electrophoresed in 8–10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (20 V and 30 min per membrane). After blocking with non-fat milk or BSA in TBST buffer, primary antibodies were added. The washed membranes were incubated with appropriate secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase

that were detected by an enhanced chemiluminescence system (USB). Antibodies against the FLAG epitope (clone M2) and anti- $\beta$ -actin (AC-74) were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-SIAH2 (sc-5507) and anti-DYRK2 (sc-66867) was obtained from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). Anti-HIPK2 was a gift from Dr. M. L. Schmitz and has been described previously [43]. Anti-HA epitope (clone 3F10) was purchased from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). Anti HIF-1 $\alpha$  (610959) was from BD Biosciences (Madrid, Spain), anti-PHD3 (ab30782) and anti-PHD2 (ab109088) from Abcam (Cambridge, UK), and anti-phospho-Akt Ser473 (9271) from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA).

#### 2.4. Immunoprecipitation

Cells were washed in PBS, collected by centrifugation and the pellet was lysed in IP buffer (50 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl and 1% Triton X-100) supplemented with 5 mM EGTA, 20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM PMSF and 10  $\mu$ g/ml of leupeptine, aprotinin and pepstatin. Before immunoprecipitation, cell lysates were pre-cleared with protein A/G PLUS agarose (Santa Cruz). Lysates were incubated with 1  $\mu$ g of antibody together with 25  $\mu$ l of the protein A/G. After rotating for 4 h at 4 °C, the beads were washed 5 times in IP buffer and eluted in 1.5 $\times$  SDS sample buffer, followed by western blotting.

#### 2.5. Luciferase reporter assays

Cells were collected, washed in PBS and lysed in luciferase buffer (25 mM Tris-phosphate pH 7.8, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, and 7% glycerol). Luciferase activity was measured using an Autolumat LB 953 (EG&G Berthold, USA) following the instructions of the luciferase assay kit (Promega, Madison, WI, USA).

#### 2.6. RNA extraction and qRT-PCR

Cells were collected in PBS and total RNA was extracted using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche). Reverse transcription was performed with the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Madrid, Spain). Real-time PCR was employed with GoTaq qPCR Master Mix (Promega) in an iCYCLER detection system (Bio-Rad). The amplification profile consisted of an initial denaturation for 5 min at 95 °C and then 40 cycles of 30 s at 95 °C, annealing for 30 s at 60 °C, and elongation for 30 s at 72 °C. A cycle of 10 s at 83 °C and a final extension for 1 min was carried out at 72 °C. Amplification efficiencies were validated and normalized against  $\beta$ -actin, and fold change in gene expression was calculated using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> method. The following primers were used:

HIF-1 $\alpha$ -forward: 5'-GAAAGCGCAAGTCTTCAAAG-3'  
 HIF-1 $\alpha$ -reverse: 5'-TGGGTAGGAGATGGAGATGC-3'  
 SIAH2-forward: 5'-CTATGGAGAAGGTGGCCTCG-3'  
 SIAH2-reverse: 5'-CGTATGGTGCAGGGTCAGG-3'  
 HK2-forward: 5'-CAAAGTGACAGTGGGTGTGG-3'  
 HK2-reverse: 5'-GCCAGTCTTCACTGTCTC-3'  
 BNIP3-forward: 5'-GCTCCAGACACCACAAGAT-3'  
 BNIP3-reverse: 5'-TGAGAGTAGCTGTGCGCTTC-3'  
 HMOX1-forward: 5'-AAGATTGCCAGAAAGCCCTGGAC-3'  
 HMOX1-reverse: 5'-AACTGTGCCACCAGAAAGCTGAG-3'  
 VEGF-forward: 5'-AGGAGGAGGGCAGAATCATCA-3'  
 VEGF-reverse: 5'-CTCGATTGGATGGCAGTAGCT-3'  
 $\beta$ -actin-forward: 5'-GCTCCTCTGACGGCAAG-3'  
 $\beta$ -actin-reverse: 5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'

#### 2.7. PCR array

One microgram of RNA was transcribed to cDNA using the RT<sup>2</sup> First Strand Synthesis Kit (SABiosciences, Frederick, MD, USA) and analyzed

using the human hypoxia signaling pathway PCR array (PAHS-032, SABiosciences) and the RT<sup>2</sup> SYBR green qPCR master mix (330510, SABiosciences). Each array consists of 84 genes involved in hypoxia-related signaling, as well as 12 sequences to control for loading and cDNA quality. The fold change in gene expression was calculated using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> method and five housekeeping genes for normalization following the manufacturer's instructions. Each array was performed in triplicate.

#### 2.8. Angiogenesis assays

HUVECs and HBMECs (2  $\times$  10<sup>4</sup>) were seeded over a uniform layer of Matrigel (BD Biosciences) in a 96-well plate. After 12 h cells were washed with PBS and stained with 5  $\mu$ M Calcein-AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Tube formation was analyzed using a 4 $\times$  objective and a BD Pathway 855 Bioimager. Attovision v 1.7 BD software was used to quantify the total length and branch points of tubes.

#### 2.9. Cell viability assay

SK-N-SH cells were seeded in a 96-well plate (7  $\times$  10<sup>3</sup> per well) for 24 h, pretreated or not with NADA 10  $\mu$ M for 3 h, and then subjected or not to hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 3 h. MTT reagent (5 mg/ml, Sigma-Aldrich) was added and incubated for 3 h at 37 °C in darkness. The formazan crystals were solubilized by the addition of 100  $\mu$ l DMSO and the absorbance at 550 nm was measured using a Multifunction Microplate Reader (TECAN GENios Pro, Switzerland). All determinations were carried out in triplicate.

#### 2.10. Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Differences were analyzed by Student's *t* test. *P* < 0.05 was considered significant. Images were analyzed and quantified using the ImageJ v1.45 software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. *N*-acyl-dopamines mediated HIF-1 $\alpha$ stabilization through CB<sub>1</sub>- and TRPV-1-independent mechanisms

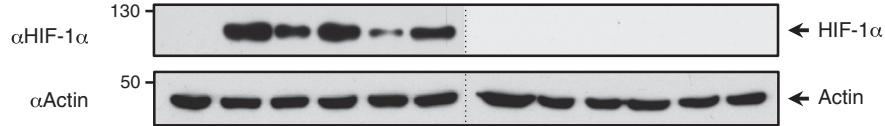
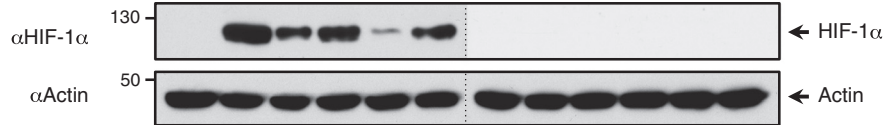
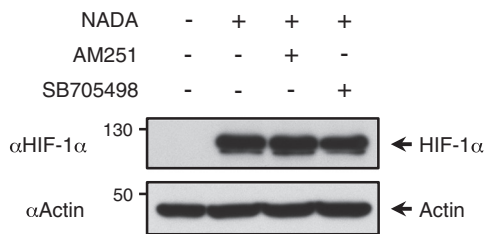
To investigate the effect of several *N*-acyl-dopamines and related compounds on the hypoxia response pathway we determined firstly the steady state levels of HIF-1 $\alpha$  protein in neuronal and non-neuronal cell lines. In Fig. 1A it is shown that both NADA and OLDA induced HIF-1 $\alpha$  expression at the protein level to the same extent than exposure to low levels of O<sub>2</sub> (1%) in HEK-293T and SK-N-SH cells. In contrast neither AEA nor dopamine was able to induce HIF-1 $\alpha$  expression in these cell lines. AM404, a hybrid molecule with CB<sub>1</sub> and TRPV-1 agonistic activities, also failed to induce HIF-1 $\alpha$  expression. Using specific chemical antagonists we investigated the involvement of CB<sub>1</sub> and TRPV-1 receptors in NADA-induced HIF-1 $\alpha$  expression in SK-N-SH cells. We found that neither AM251 (CB<sub>1</sub> antagonist) nor SB705498 (TRPV-1 antagonist) inhibited the effects of NADA on HIF-1 $\alpha$  (Fig. 1B).

*N*-acyl-dopamines are conjugates of fatty acids with dopamine via an amide bond. To investigate the role of the dopamine moiety in the induction of HIF-1 $\alpha$  we treated HEK-293T and SK-N-SH cells with the four endogenous *N*-acyl-dopamines described so far [2,5], namely NADA, OLDA, PALDA and STEARDA. As depicted in Fig. 1C all the *N*-acyl-dopamines analyzed were able to induce HIF-1 $\alpha$  expression. Moreover, related endogenous endolipids such as *N*-arachidonoyl-L-tyrosine or synthetic analogs based on hydroxytyrosol, a metabolite of dopamine, such as arachidonoyl hydroxytyrosol ester, oleyl

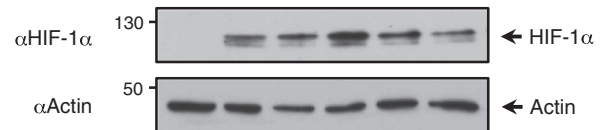
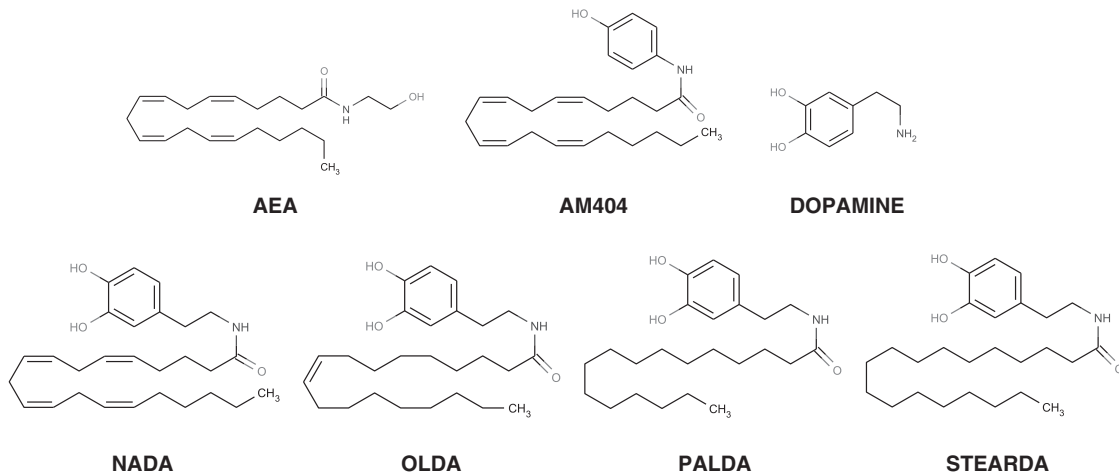
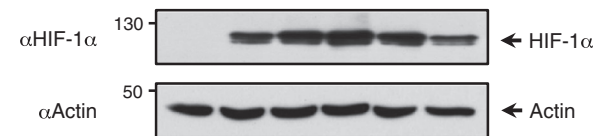


**A**

NADA (μM)	-	-	5	10	-	-	-	-	-	-	
OLDA (μM)	-	-	-	-	5	10	-	-	-	-	
AEA (μM)	-	-	-	-	-	-	5	10	-	-	
AM404 (μM)	-	-	-	-	-	-	-	-	5	10	
Dopamine (μM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	10
Hypoxia	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**293T****SK-N-SH****B****C**

Hypoxia	-	+	-	-	-	-
NADA	-	-	+	-	-	-
OLDA	-	-	-	+	-	-
PALDA	-	-	-	-	+	-
STEARDA	-	-	-	-	-	+

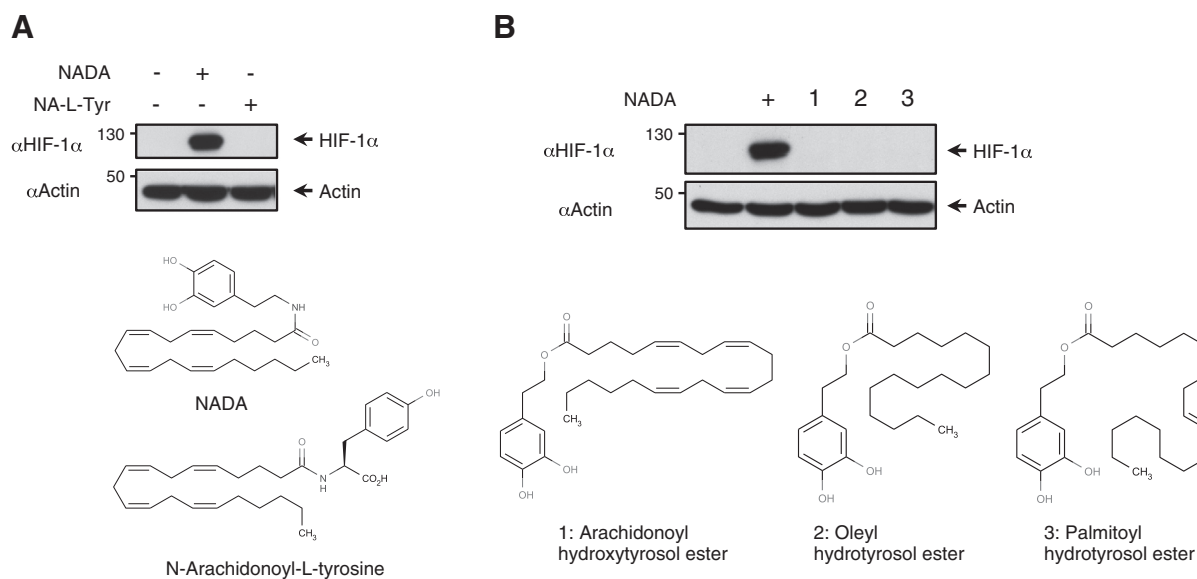
**293T****SK-N-SH**

**Fig. 1.** *N*-acyl-dopamines mediate CB<sub>1</sub>/TRPV1-independent HIF-1α stabilization. (A) HEK-293T and SK-N-SH cells were incubated with the different compounds at the indicated doses for 6 h. Hypoxia was induced by the cultivation of cells at 1% O<sub>2</sub> concentrations for 6 h. The expression of HIF-1α protein was determined by immunoblot analysis. (B) SK-N-SH cells were incubated with AM251 (CB<sub>1</sub> antagonist) or SB705498 (TRPV-1 antagonist) for 30 min and stimulated with NADA (10 μM) for 6 h. The expression of HIF-1α protein was determined by immunoblot analysis. We show a representative blot of three independent experiments. (C) Upper panel: cells were treated with the indicated compounds at the same concentration and hypoxia was induced as described above. We show a representative blot out of three independent experiments and the positions and molecular weights (in kDa) are indicated. Lower panel: Chemical structures.

hydrotyrosol ester and palmitoyl hydrotyrosol ester failed to induce HIF-1α in SK-N-SH cells (Fig. 2A and B). Altogether these results indicate that the hydroxyl groups of the dopamine moiety are critical for the hypoximimetic activity of *N*-acyl-dopamines.

### 3.2. NADA stabilizes HIF-1α in different neuronal cell types

To study whether this HIF-1α regulatory mechanism is present in different neuronal cells we analyzed the effect of NADA on MO3.13



**Fig. 2.** Hydroxyl groups of the dopamine moiety are critical for the hypoximimetic activity of *N*-acyl-dopamines. (A–B) Upper panel: SK-N-SH cells were treated with the indicated compounds at the same concentration (10  $\mu$ M) for 6 h and analyzed for HIF-1 $\alpha$  expression as shown. We show a representative blot of three independent experiments. Lower panel: Chemical structures.

(oligodendroglial) (Fig. 3A) and U87 (glioblastoma) (Fig. 3B) cell lines. The cells were either subjected to hypoxia (1% O<sub>2</sub>) or stimulated with NADA and the levels of HIF-1 $\alpha$  detected by immunoblot. In both cell lines NADA induced HIF-1 $\alpha$  expression at levels similar to those obtained in response to hypoxia. To further investigate the effect of NADA on primary cells we used human primary astrocytes and neurons. We found that NADA also induced HIF-1 $\alpha$  expression in astrocytes (Fig. 3C) and in neurons (Fig. 3D), although in the case of astrocytes the levels were lower than those obtained in response to hypoxia. The differential effect of NADA in the cells analyzed may reflect the singular expression of the specific target(s) for NADA to induce HIF-1 $\alpha$  expression.

Next, we investigated the effect of NADA on the HIF-1 $\alpha$  expression at the mRNA and protein levels in SK-N-SH cells. As shown in Fig. 3E, NADA stimulation significantly increased HIF-1 $\alpha$  expression at the protein level. However, the levels of mRNA for HIF-1 $\alpha$  were not significantly changed as revealed by qPCR. Likewise, we monitored HIF-1 $\alpha$  protein half-life after NADA and hypoxia treatment in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). As shown in Fig. 3F, HIF-1 $\alpha$  half-life was higher in the NADA treatment compared to the hypoxia condition (22.1 vs 7.9 min). Altogether these results clearly indicate that NADA directly affects HIF-1 $\alpha$  stabilization.

### 3.3. NADA induces degradation of PHD3 and does not synergize with hypoxia to stabilize HIF-1 $\alpha$

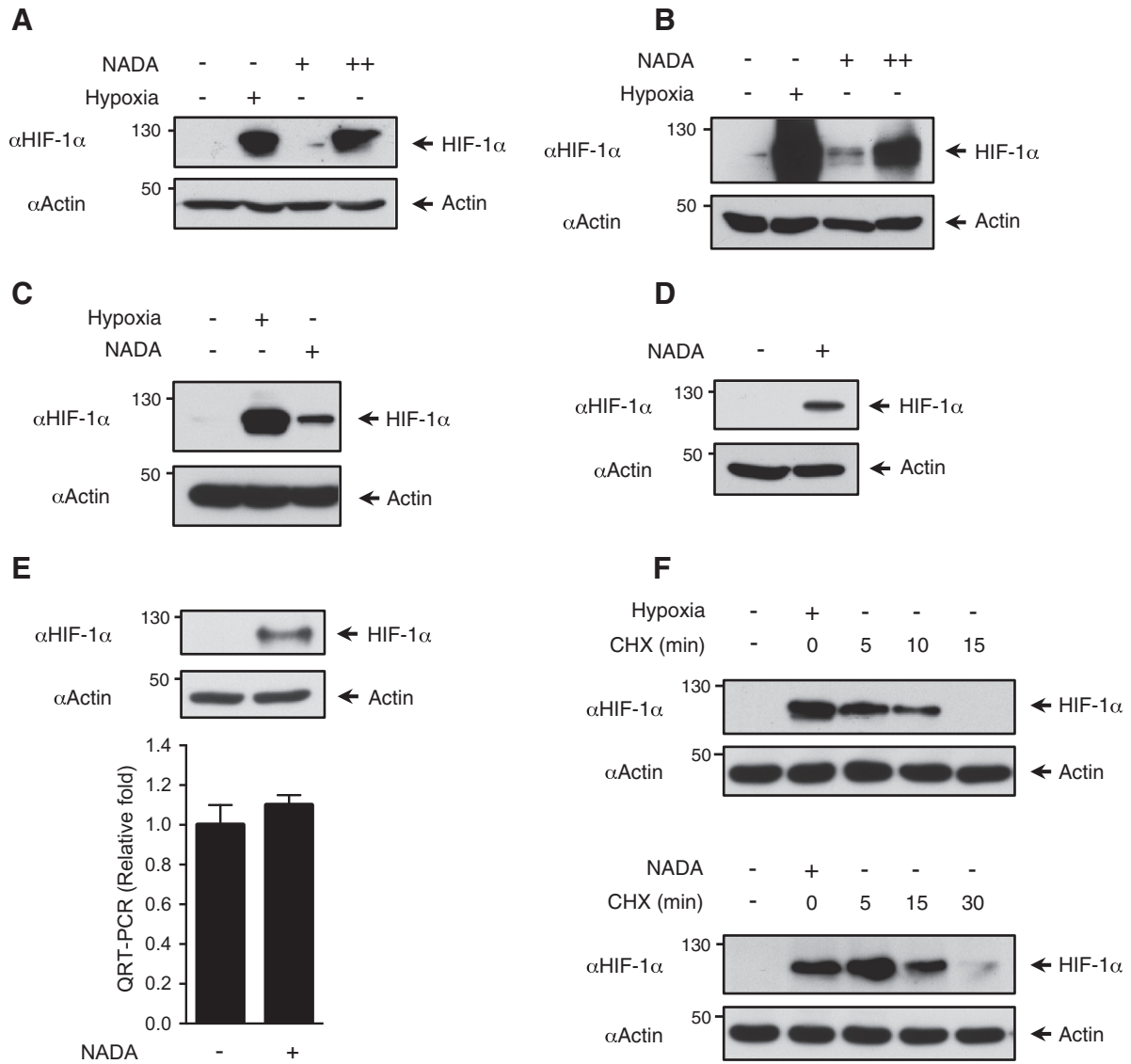
To study in detail the HIF-1 $\alpha$  regulatory pathway in response to stimulation with *N*-acyl-dopamines, SK-N-SH cells were treated with NADA at the indicated times and the steady state levels of HIF-1 $\alpha$ , PHD2 and PHD3 proteins analyzed by immunoblotting. As shown in Fig. 4A (upper panel), NADA caused a clear HIF-1 $\alpha$  stabilization after 1 h, had a peak at 3 h and started to decrease after 6 h. The HIF-1 $\alpha$  stabilization was accompanied by a gradual decrease in PHD3 levels, without affecting the PHD2 levels. In parallel, to evaluate the effect of HIF-1 $\alpha$  stabilization by NADA, SK-N-SH cells were transiently transfected with the HIF-dependent reporter constructs Epo-Luc (containing an HIF-responsive element from the erythropoietin gene) and stimulated in the same conditions described above (Fig. 4A, lower panel). These results clearly indicate that HIF-1 $\alpha$  stabilization mediated by NADA is also accompanied by an increase of the transactivation capability of HIF-1 $\alpha$ .

Next, we were interested in determining if NADA affected the induction of HIF-1 $\alpha$  in cells cultured under hypoxic conditions. SK-N-SH cells were subjected to hypoxia (1% O<sub>2</sub>) in the presence or the absence of NADA. We found that NADA causes HIF-1 $\alpha$  stabilization with levels similar to those obtained under hypoxia conditions, and the combination of both stimuli produced no significant change (Fig. 4B). Similar to the previous experiment, PHD2 levels were almost unaffected in response to both conditions, whereas PHD3 levels clearly decreased in relation to HIF-1 $\alpha$  expression. As expected, the transcriptional activity of HIF-1 $\alpha$  on the Epo-Luc reporter was not affected by the treatment of hypoxic cells with NADA (Fig. 4B, lower panel). Collectively, these experiments suggest that HIF-1 $\alpha$  stabilization mediated by NADA is conducted through a signaling pathway that is also activated in response to hypoxia without affecting PHD2 expression.

Finally, and knowing HIF-1 $\alpha$  stabilization kinetics in response to NADA, we decided to calculate EC<sub>50</sub> after 3 h of stimulation (Fig. 4C). Endocannabinoids such as AEA can bind bovine serum albumin and this property could interfere to establish the potency of NADA in cell cultures [44]. Therefore, SK-N-SH cells were grown for 12 h in the presence or absence of FCS and stimulated with different concentrations of NADA. HIF-1 $\alpha$  levels were analyzed by western blotting and quantified through densitometry using actin as the housekeeping protein. We found that NADA has an EC<sub>50</sub> of 2.6  $\mu$ M, which was reduced to 2.3  $\mu$ M after serum withdrawal.

### 3.4. SIAH2 expression is affected by NADA

To determine the mechanism of action of NADA on hypoxia response pathway, firstly we studied the effect of this *N*-acyl-dopamine on the SIAH2 protein. This ubiquitin ligase controls HIF-1 $\alpha$  levels mainly through PHD3 degradation in response to low levels of oxygen (1% to 5% oxygen) [23]. To assess this point, different amounts of SIAH2 were co-expressed with PHD3 in the presence or absence of NADA. As shown in Fig. 5A, SIAH2 expression degraded PHD3 in a dose-dependent manner, whereas HIF-1 $\alpha$  levels did not change significantly. Contrary to our expectations, NADA stimulation produced a clear inhibition of SIAH2 expression and therefore we investigated the impact of NADA on the endogenous SIAH2 levels. As shown in Fig. 5B, increasing amounts of NADA resulted in a dose-dependent decrease in SIAH2 protein levels without affecting the gene expression, indicating that the effect of NADA on SIAH2 expression relied at the protein level. To further



**Fig. 3.** NADA stabilizes HIF-1 $\alpha$  in different neuronal cells. M03.13 (A) and U87 (B) cells were either subjected to hypoxia (1% O<sub>2</sub>) or stimulated with NADA (+, 1  $\mu$ M; ++, 10  $\mu$ M) for 6 h and analyzed for HIF-1 $\alpha$  expression as shown. (C) Human primary astrocytes were either subjected to hypoxia (1% O<sub>2</sub>) or stimulated with NADA (10  $\mu$ M) for 6 h. HIF-1 $\alpha$  expression was analyzed by immunoblotting with the indicated antibody. (D) Human primary neurons were incubated for 6 h with NADA (10  $\mu$ M). The expression of HIF-1 $\alpha$  protein was determined by immunoblot analysis. We show a representative blot out of three independent experiments. (E) SK-N-SH cells were stimulated with NADA (10  $\mu$ M) for 6 h, lysed and further analyzed for HIF-1 $\alpha$  protein expression by immunoblots (upper panel) and mRNA expression by qPCR (lower panel). Data are mean  $\pm$  SD of n = 3 experiments. (F) SK-N-SH cells were either subjected to hypoxia (1% O<sub>2</sub>) or stimulated with NADA (10  $\mu$ M) for 6 h, washed twice with PBS and treated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) (40  $\mu$ g/ml) for the indicated time. HIF-1 $\alpha$  expression was analyzed by immunoblotting using actin expression as the loading control. We show a representative blot out of three independent experiments.

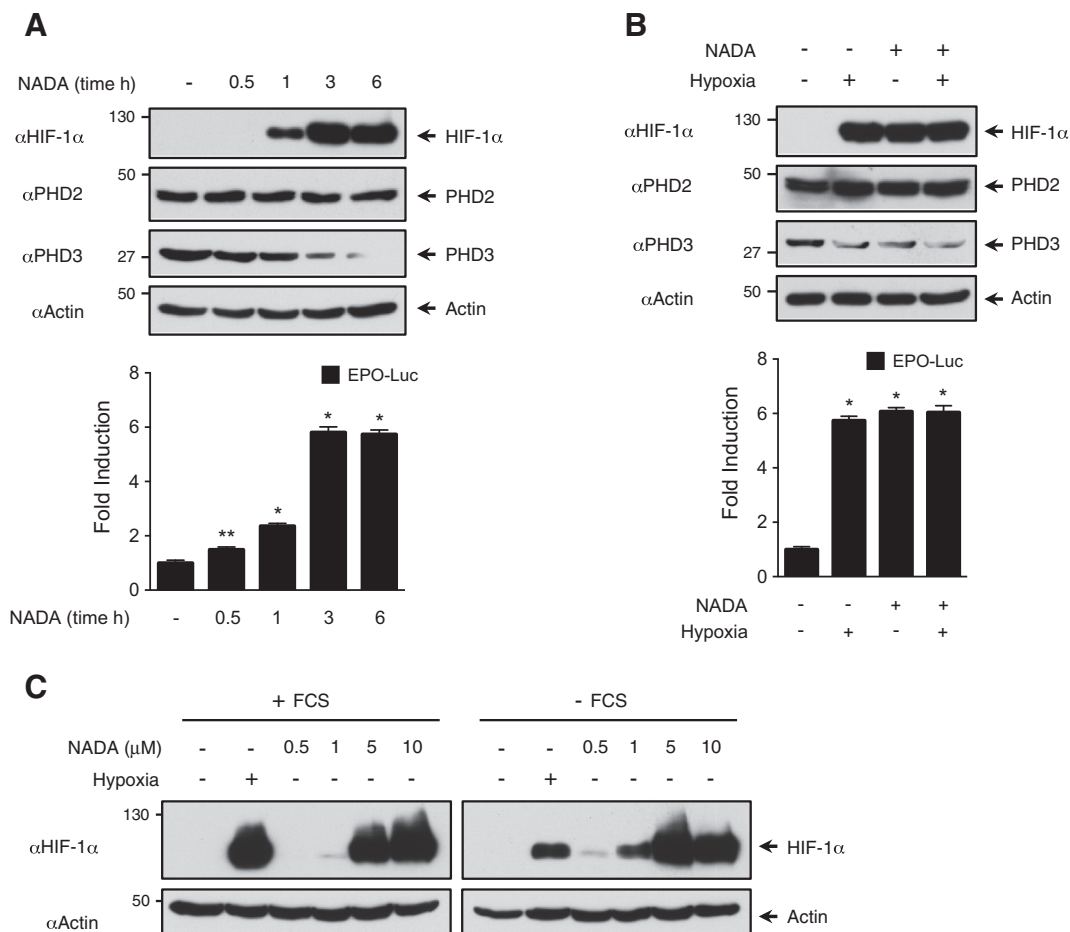
investigate this possibility we expressed SIAH2 and the cells were treated with NADA in the presence or absence of the proteasome inhibitor MG-132. We found that NADA strongly inhibited SIAH2 expression and this effect was almost completely abolished in the presence of MG-132. Altogether our data indicate that NADA-mediated SIAH2 degradation is performed by the proteasome (Fig. 5C).

To demonstrate the contribution of SIAH2 in NADA-induced HIF-1 $\alpha$  stabilization, we knocked down SIAH2 by siRNA treatment. As shown in Fig. 5D (and Supplementary Fig. 1), SIAH2 silencing drastically reduced the expression of HIF-1 $\alpha$  in response to NADA treatment. Similarly, inhibition of SIAH2 expression induced stabilization of PHD3 in response to NADA. A comparison of MEFs lacking Siah1a/2 revealed that NADA-induced PHD3 degradation was more prominent in wild type cells (Fig. 5E). Finally, and to confirm the role of PHD3 on HIF-1 $\alpha$  stabilization in response to NADA, we over-expressed PHD3 and analyzed the effect of NADA on endogenous HIF-1 $\alpha$  expression. As shown in Fig. 5F, transfection of PHD3 decreased NADA-induced stabilization of HIF-1 $\alpha$ ,

suggesting that the abundance of PHD3 is determinant to mediate NADA-induced HIF-1 $\alpha$  stabilization. Collectively, these experiments showed that SIAH2 and PHD3 play a relevant role, but not exclusively, in NADA-induced HIF-1 $\alpha$  stabilization. However other proteins with function similar to SIAH1 and PHD1 could also exhibit functional redundancy in this process.

### 3.5. NADA increases SIAH2 activity and decreases SIAH2 protein level

Are *N*-acyl-dopamines affecting SIAH2 activity? One of the main characteristics of RING domain E3 ubiquitin ligases is their ability to limit their own availability through self-ubiquitination and degradation [39]. The capacity of NADA to inhibit the expression of both SIAH2 and its substrate PHD3 (Fig. 5A) led us to consider the possibility that this *N*-acyl-dopamine is increasing the E3 ligase activity of SIAH2, and therefore its own degradation. To test this hypothesis, first we analyzed the effect of NADA on a SIAH2 point ligase-deficient mutant (SIAH2 RM,



**Fig. 4.** NADA does not synergize with Hypoxia. (A) SK-N-SH cells were transfected with a HIF-1 $\alpha$ -responsive vector, and erythropoietin promoter-controlled luciferase construct (Epo-Luc). Twenty-four hours later, cells were stimulated with NADA (10  $\mu$ M) at the indicated times, lysed and further analyzed for HIF-1 $\alpha$ , PHD2 and PHD3 expression by immunoblots (upper panel) and luciferase expression (upper panel). Data are mean  $\pm$  SD of  $n = 3$  experiments. \* $P = 0.0039$ , \*\* $P < 0.0001$ . (B) SK-N-SH cells were transfected with Epo-Luc vector and 48 h later were either subjected to hypoxia (1% O $_2$ ) or/and stimulated with NADA (10  $\mu$ M) for 6 h. Cells were harvested and one aliquot was analyzed for the levels of the HIF-1 $\alpha$ , PHD2 and PHD3 proteins by immunoblots while another aliquot was used to study luciferase expression. Data are mean  $\pm$  SD of  $n = 3$  experiments. \* $P < 0.0001$ . (C) SK-N-SH cells were grown in medium with or without FCS (fetal calf serum) for 12 h and were either subjected to hypoxia (1% O $_2$ ) for 6 h or stimulated with NADA at the indicated concentration for 3 h. HIF-1 $\alpha$  expression was analyzed by immunoblotting with the indicated antibody. We show a representative blot out of three independent experiments.

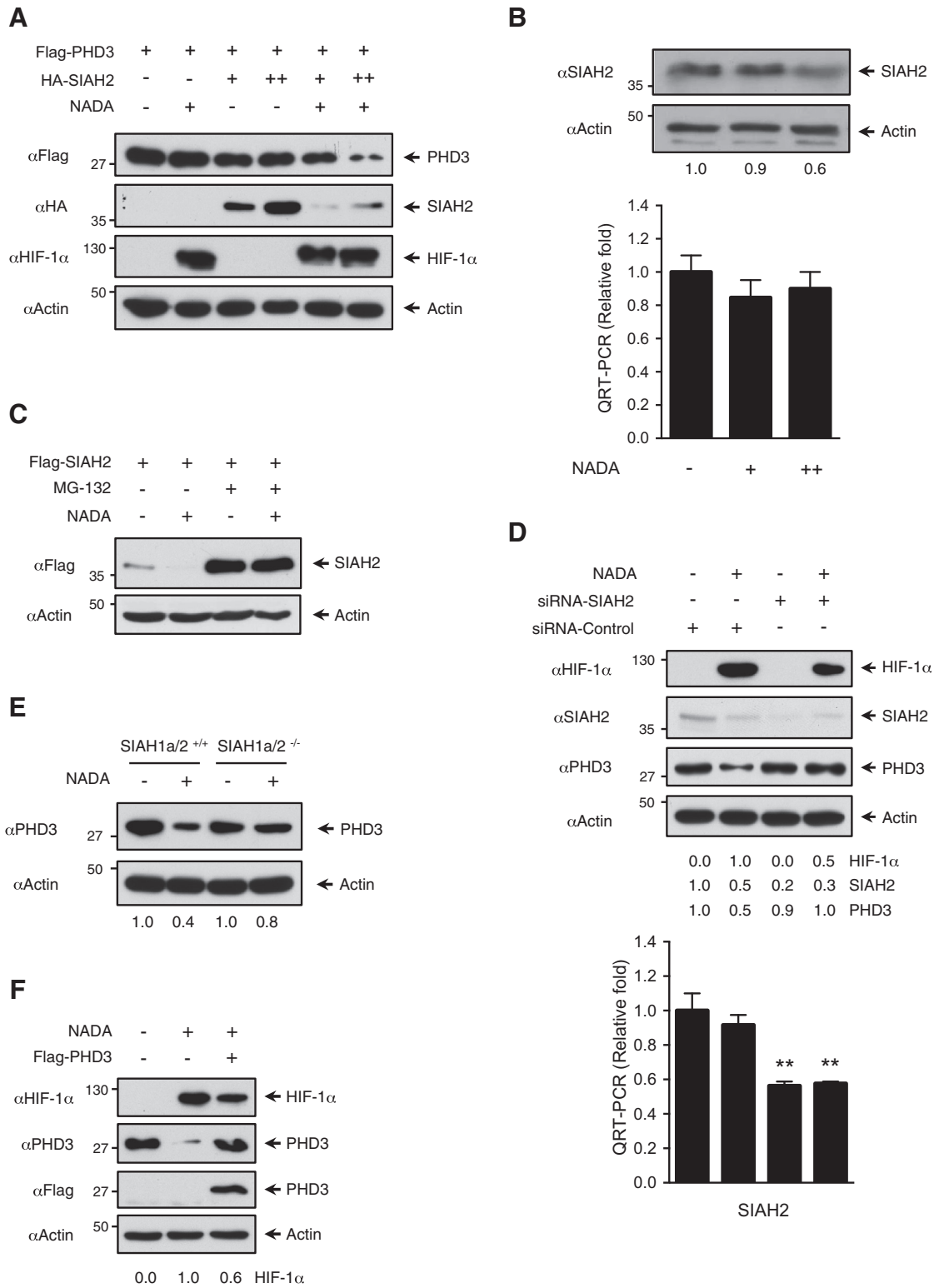
Ring Mutant, H98A/C101A). As shown in Fig. 6A, NADA did not affect the stability of SIAH2 RM in the absence or presence of MG-132 and similarly to the previous results, NADA induced HIF-1 $\alpha$  stabilization. These findings support the hypothesis that NADA can affect SIAH2 self-degradation, since its effect depends on intact RING domain.

To determine whether NADA altered SIAH2 stability, we monitored SIAH2 half-life in the presence of cycloheximide (CHX). As shown in Fig. 6B, HEK-293T cells stimulated with NADA reduced the half-life of SIAH2 protein from 6 to 3 h. However, no significant change was observed in the case of SIAH2 RM. All these data suggest that NADA ability to reduce SIAH2 stability is due to its ability to increase the E3 ligase activity of SIAH2. To demonstrate that NADA increases SIAH2 activity by affecting its auto-ubiquitination, we decided to compare the SIAH2 ubiquitination levels in the presence or absence of NADA. We co-expressed HA-Ubiquitin and Flag-SIAH2 with or without NADA in the presence of MG-132, and analyzed the ubiquitination status of SIAH2 after immunoprecipitation and immunoblotting. These experiments showed that NADA strongly stimulated basal SIAH2 polyubiquitination (Fig. 6C), and demonstrated that NADA increased SIAH2 activity.

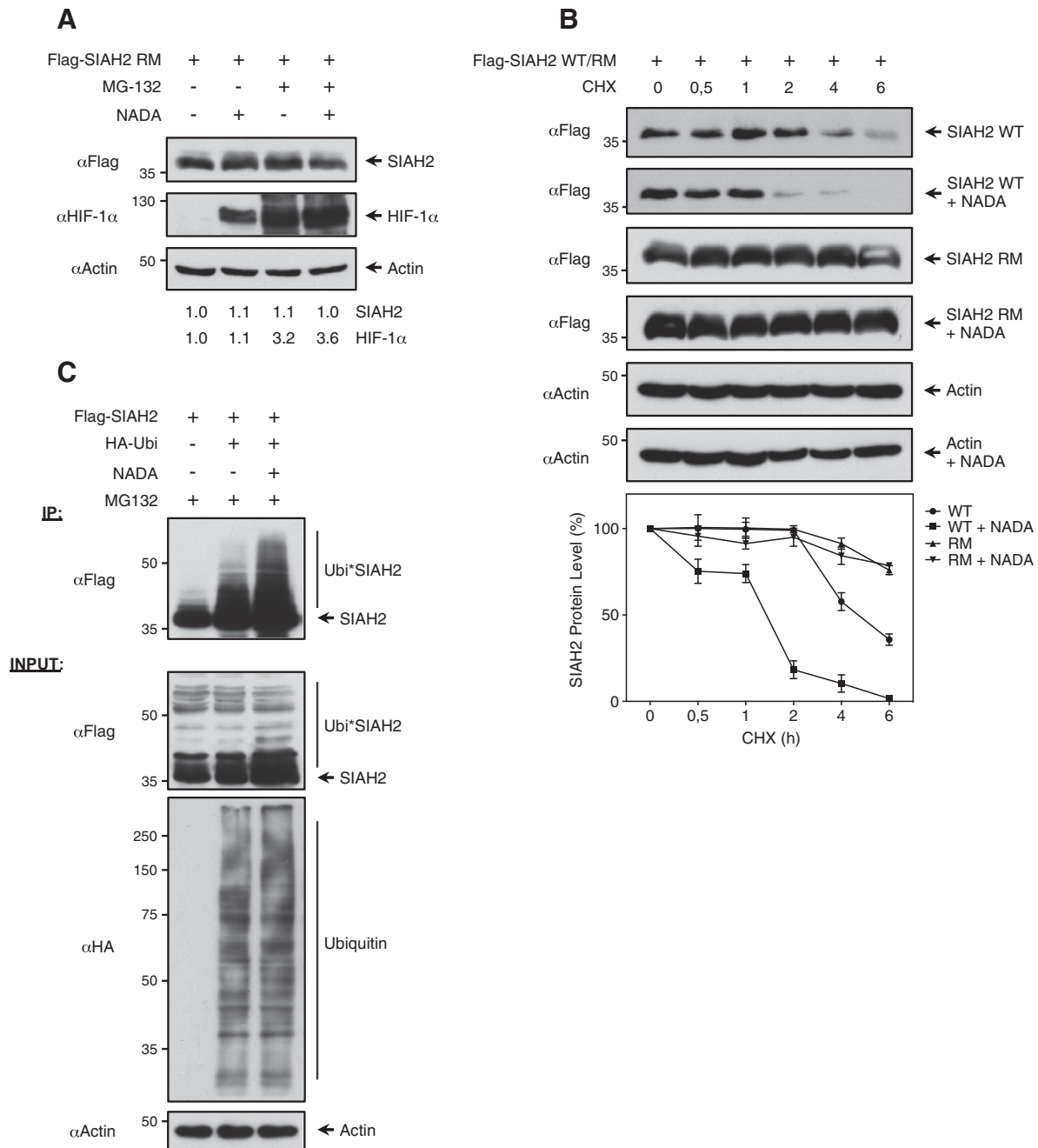
We next undertook experiments designed to determine how NADA affects SIAH2 protein regulation. Firstly, we explored the possibility that NADA could be altering the SIAH2 dimerization, one of the key regulatory mechanisms that control its catalytic activities. Co-expression of Flag-SIAH2 and HA-SIAH2 in HEK-293T cells showed strong interaction in the presence and absence of NADA (Fig. 7A). No differences were

observed between the SIAH2 expression after the immunoprecipitation in the presence of NADA and the input levels, indicating that SIAH2 dimerization is not affected. Similar results were obtained using the SIAH2-RM mutant (Fig. 7B). Secondly, since it has been previously described that the PI3K/AKT pathway mediated the regulation of SIAH2 expression [45], we analyzed the possible role of this pathway on NADA-induced HIF-1 $\alpha$  expression. To this end, the cells were stimulated with NADA in the absence and the presence of a LY 294002, a PI3K inhibitor, and the expression of phospho-AKT and HIF-1 $\alpha$  determined by immunoblots. We found that NADA slightly increased AKT phosphorylation but HIF-1 $\alpha$  expression was not affected in the presence of LY 294002 (Fig. 7C), which indicates that the AKT pathway is not involved in this process.

Next, we asked whether the SIAH2 phosphorylation level, the best-described mechanisms responsible for regulating SIAH2 activity, was involved in this process. Several protein kinases able to phosphorylate SIAH2 in different residues modifying their activity have been described [29,35,40]. We study the ability of NADA to alter SIAH2 wild type stability compared with the SIAH2 mutants where all the phosphorylation sites described have been either mutated to alanine (SIAH2-5A; Ser16, Thr26, Ser28, Ser68, and Thr119) or in a phosphorylation-mimicking fashion to aspartic acid (SIAH2-5D). HEK-293T cells were transfected with Flag-SIAH2-WT, Flag-SIAH2-5A, and Flag-SIAH2-5D and treated with NADA. We found that SIAH2 stability in all the cases was inhibited by NADA to a similar extent (Fig. 7D). Similarly, NADA did not affect the



**Fig. 5.** SIAH2 expression is affected by NADA. (A) HEK-293T cells were transfected with the indicated plasmids to express Flag-PHD3 and different amounts of SIAH2. After 36 h, NADA (10 μM) was added for another 6 h. Cells were lysed and protein expression was evaluated by immunoblot with the indicated antibodies. (B) HEK-293T cells were stimulated with NADA (+, 1 μM; ++, 10 μM) for 10 h, and harvested and one aliquot was analyzed for the levels of the SIAH protein by immunoblot (upper panel) while another aliquot was analyzed by qPCR to measure SIAH2 mRNA levels (lower panel). Data are mean ± SD of n = 3 experiments. The values below the gels indicate SIAH2 protein signal intensities (quantified using ImageJ) after normalization to actin signal intensities. (C) HEK-293T cells were transfected to express Flag-SIAH2 and stimulated with NADA (10 μM) in the presence or absence of 10 μM of MG-132 as shown. Cell lysates were analyzed by immunoblot with the indicated antibodies. (D) HEK-293T cells were transfected with 100 nM of SIAH2 or scrambled (control) siRNAs. After 4 days, cells were stimulated with NADA (10 μM) for 10 h, and lysed and one aliquot was analyzed for the levels of endogenous protein expression by immunoblot with the indicated antibodies (upper panel, one representative experiment out of three replicates is shown. Supplementary Fig. 1) while another aliquot was analyzed by qPCR to measure SIAH2 mRNA levels (lower panel). Data are mean ± SD of n = 3 experiments. \*\*P < 0.001. The values below the gels indicate SIAH2, PHD3 and HIF-1α protein signal intensities (quantified using ImageJ) after normalization to actin signal intensities. (E) Knockout MEFs lacking Siah1a and Siah2 genes and wildtype controls were treated for 6 h with NADA (10 μM), and lysed and PHD3 endogenous protein expression was evaluated by immunoblot using actin expression as the loading control. The values below the gels indicate PHD3 protein signal intensities (quantified using ImageJ) after normalization to actin signal intensities. (F) HEK-293T cells were transfected with Flag-PHD3 to obtain a similar PHD3 level to endogenous after 6 h of stimulation with NADA (10 μM). Cells were lysed and protein expression was evaluated by immunoblot with the indicated antibodies. The values below the gels indicate HIF-1α protein signal intensities (quantified using ImageJ) after normalization to actin signal intensities.



**Fig. 6.** NADA increases SIAH2 activity and decreases SIAH2 protein expression. (A) HEK-293T cells were transfected to express SIAH2 Ring Mutant (RM) and after 36 h were stimulated with NADA (10  $\mu$ M) in the presence or absence of MG-132. After 10 h, cells were lysed and SIAH2 and HIF-1 $\alpha$  protein expression was analyzed by immunoblot. The values below the gels indicate SIAH2 and HIF-1 $\alpha$  protein signal intensities (quantified using ImageJ) after normalization to actin signal intensities. (B) HEK-293T cells were transfected with FLAG-SIAH2 wild-type (WT) or SIAH2 Ring Mutant (RM) and treated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) (40  $\mu$ g/ml) for 0.5, 1, 2, 4, and 6 h in the presence or absence of NADA (10  $\mu$ M). Cell lysates were analyzed by immunoblot using actin expression as the loading control. The graph represents the mean  $\pm$  SD of band density from 3 different experiments. (C) HEK-293T cells were transfected with Flag-SIAH2, and HA-tagged ubiquitin and 36 h later stimulated with NADA (10  $\mu$ M) in the presence of MG-132. A fraction of the extract was analyzed by western blotting for the occurrence and ubiquitination of SIAH2 (INPUT, lower panel). Another aliquot was lysed and subjected to immunoprecipitation (IP, upper panel) using anti-Flag antibody. After elution the Flag-SIAH2 protein was detected by western blotting. The position of ubiquitinated SIAH2 is indicated.

SIAH2 phosphorylation levels mediated by HIPK2 (Fig. 7E). Moreover, NADA induced a clear inhibition in the expression of both over-expressed and endogenous HIPK2 and DYRK2 proteins (SIAH2-specific substrates) (Fig. 7F and G). All these results indicate that SIAH2 phosphorylation is not involved in the mechanism of action of NADA.

### 3.6. NADA increases the expression of neuroprotective genes and angiogenesis

To determine the consequences of HIF-1 $\alpha$  stabilization mediated by NADA, next we decided to study its effect on gene expression. Human

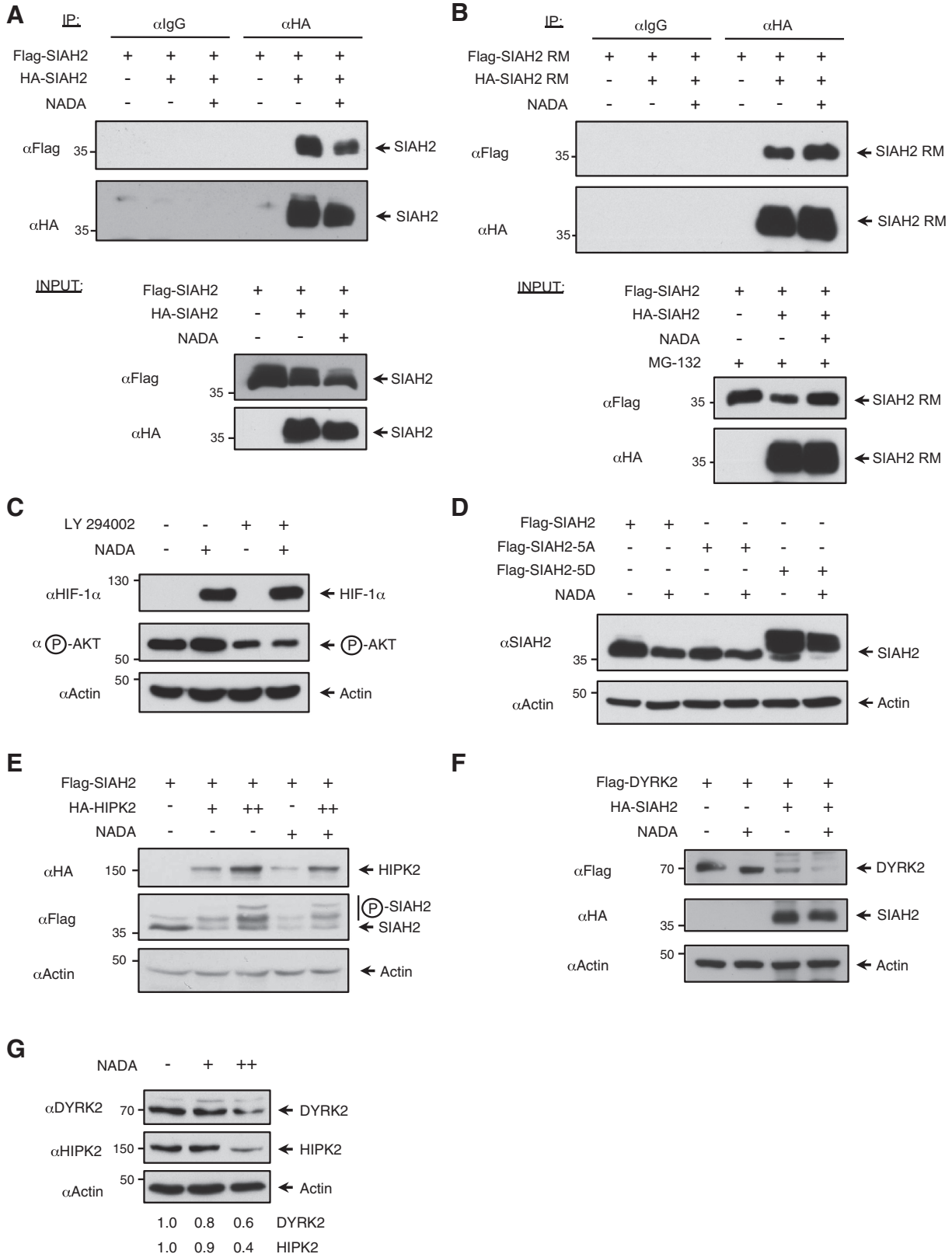
primary astrocytes were stimulated with NADA (10  $\mu$ M for 6 h) and mRNA levels of 84 genes involved in the hypoxia response pathway were studied through qPCR array analysis (Fig. 8A). From the analyzed genes, 18 showed changes when compared with the normoxic situation (Table 1). Interestingly, HIF-1 $\alpha$  target genes such as HMOX1, HK2, VEGFA and BNIP3 are related with cell survival and neuroprotection and were upregulated by NADA in primary astrocytes.

Next we analyzed in detail the expression of selected genes by qRT-PCR, to determine if NADA affected their induction in human primary astrocyte cells cultured under hypoxic conditions. As shown in Fig. 8B,

NADA induced the expression of HMOX1, HK2 and BNIP3 to levels similar to those obtained under hypoxia conditions, and the combination of both stimuli produced no significant changes. In contrast, we observed a synergy of both stimuli in the case of VEGFA expression.

To further evaluate *N*-acyl-dopamines' capacity to induce cell survival in response to hypoxia, we decided to investigate the potential

cytoprotective effect of NADA in response to hypoxia in an in vitro model of hypoxia-induced cell death [46,47]. SK-N-SH cells were pretreated or not with NADA for 3 h and then subjected to hypoxia for 3 more hours. As shown in Fig. 8C, NADA alone did not affect cell viability but significantly ( $P = 0.0036$ ) protected the cells from hypoxia-induced cytotoxicity. Finally, to test the functional consequences of



NADA stimulation in a physiological model, we measured endothelial cell tube formation as a model of angiogenesis. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs; Fig. 8D) and human brain microvascular endothelial cells (HBMECs; Fig. 8E) were stimulated with NADA (10  $\mu$ M) for 6 h and tube formation was quantified using a BD Pathway TM Bioimager. NADA stimulation resulted in an increase in the branch points of tubes in HUVEC and HBMEC and in an increase in the total length of tubes in HUVEC but not in HBMEC.

#### 4. Discussion

Neuronal damage secondary to brain injuries such as cerebral hypoxia and neurodegenerative process, is a complex process that involves inflammatory changes. The activation of a common mechanism related to survival or cell death, mediated by the stabilization and trans-activation of HIF-1 $\alpha$ , has been observed in these conditions. PHDs are the gatekeepers for the oxygen-dependent degradation of HIF-1 $\alpha$  and also function as integrated sensors of cellular metabolism [48]. The phenomenon that hypoxic preconditioning (HP) protects against subsequent severe anoxia was discovered approximately two decades ago, and subsequently has been demonstrated in different hypoxic model systems [15]. Therefore PHD inhibition by hypoximimetic small-molecules represents an interesting strategy or the development of neuroprotective therapies and for prevention against hypoxic conditions [15].

We previously described that NADA and OLDA also inhibit NF- $\kappa$ B by targeting the phosphorylation of p65/RelA [9]. Although the role of NF- $\kappa$ B in neuroprotection has been controversial, it has been shown that NF- $\kappa$ B inhibition results in neuroprotection in different experimental models. Microglial NF- $\kappa$ B activation has been proposed to promote brain damage via induction of pro-inflammatory cytokines [49]. In addition, strong evidence indicates that NF- $\kappa$ B activation in neurons contributes to ischemia-induced neuronal injury [49]. Thus, *N*-acyl-dopamines may exert neuroprotective activity through pleiotropic mechanisms that include at least HIF-1 $\alpha$  induction, NF- $\kappa$ B inhibition and CB<sub>1</sub> activation.

What is the mechanism responsible for the observed effect of *N*-acyl-dopamines in this study? Different conditions able to modify the levels and activity of SIAH family proteins, including glucose level changes, DNA damage, apoptosis and hypoxia have been described [23,50–53]. In the literature there are only a few data about the regulation capacity of SIAH2 at a transcriptional level in response to these stimuli [36,37,54]. However, there is an abundance of mechanisms mediated through post-translational modifications. It has been described that activation of the AKT pathway can increase transcription levels of SIAH2, modulating hypoxic signaling through PHD3 degradation and HIF-1 $\alpha$  stabilization [45]. Experiments of HIF-1 $\alpha$  stabilization in response to NADA were not affected in the presence of the PI3K/Akt inhibitor LY 294002. These results, together with the lack of effects observed in SIAH2 transcription, seem to rule out a possible role of NADA on this pathway.

Among the post-translational modifications described to date which are able to regulate SIAH2, the capacity to self-ubiquitinate under normal physiological conditions to limit its availability and activity stands out [55]. This ability is regulated by other post-translational SIAH2

modifications, such as the phosphorylation performed by different protein kinases in response to several stimuli [29,35], as well as by the action of select deubiquitinating enzymes [56]. Others and we have described the kinases able to phosphorylate SIAH2, such as p38, HIPK2 and DYRK2, affecting the residues serines 16, 28 and 69 and threonines 26 and 119 [29,40,57]. In this study we have analyzed in detail how the presence of NADA directly affects SIAH2 phosphorylation and activity mediated by DYRK2 and HIPK2. Similarly, we have analyzed the effect of NADA on different mutants where all the phosphorylation sites described to date have been mutated either to alanine or in a phosphorylation-mimicking fashion to aspartic acid. We found that SIAH2 phosphorylation and stability levels were altered by NADA in a similar way in all cases. Altogether, these data seem to indicate that SIAH2 phosphorylation in these residues is not involved in the NADA action mechanism. However, we cannot rule out the possibility that NADA could target an unidentified upstream kinase able to phosphorylate and modify SIAH2. Likewise, we cannot discard that NADA may exert its effect through the alteration of another post-translational regulation mechanism which could enhance SIAH2 activity.

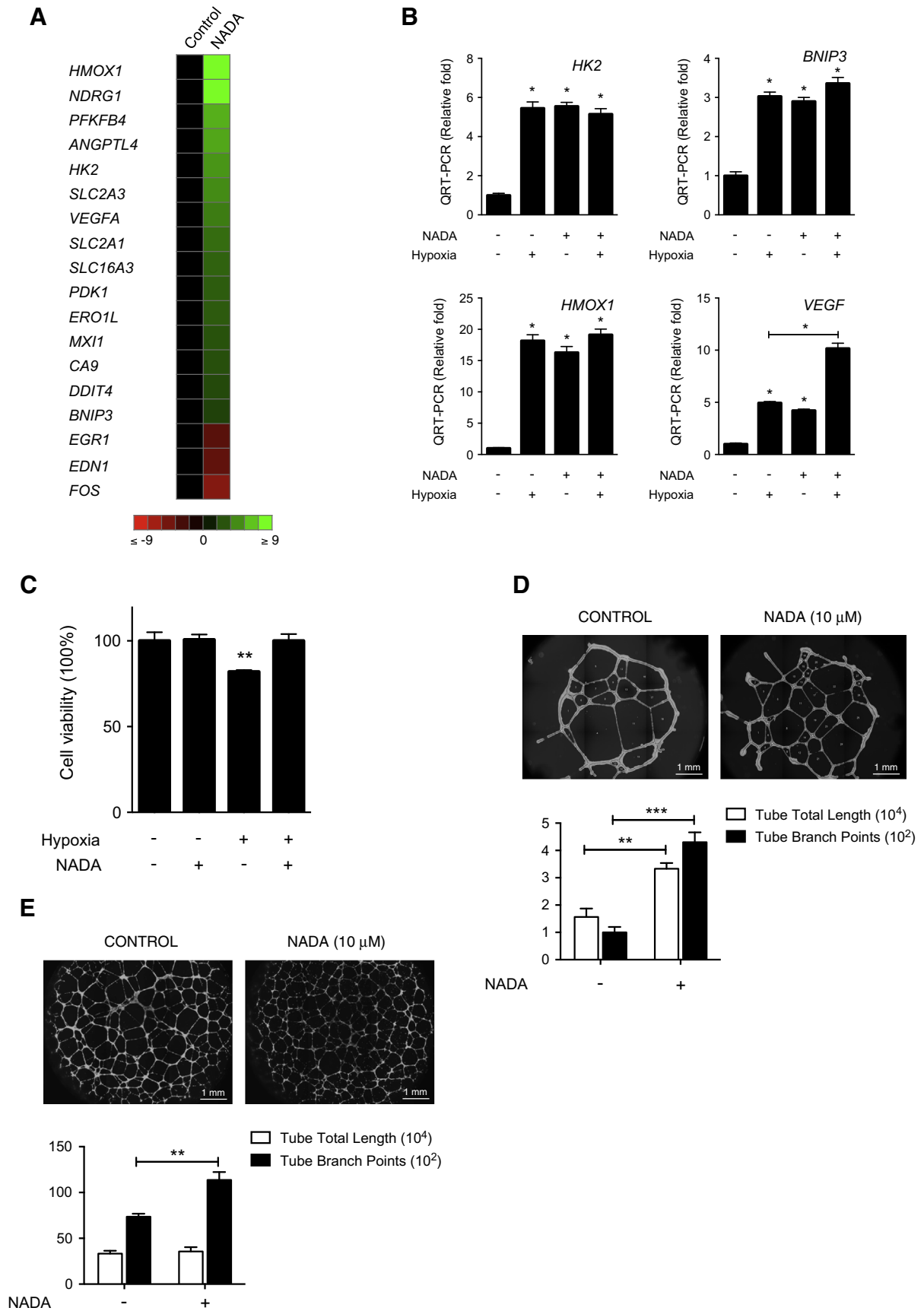
Another mechanism we considered was the possible direct interaction between *N*-acyl-dopamines and SIAH2. Until nowadays menadione (Vitamin K3) is the only described compound able to inhibit SIAH2 activity, which is possibly due to a direct effect on its conformation [42]. In the case of the opposing effect exerted by NADA, although we have not experimentally ruled out a direct interaction, it does not seem probable in the light of our results. The inability of NADA to alter the interaction between SIAH2 dimers, as well as its lack of effect on SIAH2 interaction with some of its substrates (data not shown), seems to discard this possibility.

Since the concentrations of NADA in normal and pathological conditions are unknown, it is difficult to speculate about the physiological relevance of our findings. However, the relatively high concentrations of NADA (EC<sub>50</sub>: 2.6  $\mu$ M) required for HIF-1 $\alpha$  induction should not be seen as evidence against a physiological role for this *N*-acyl-dopamine. NADA was detected in the rat striatum at nanomolar concentrations but it has been described that NADA is short-lived and thus difficult to measure [2,8,58]. It is well known that endocannabinoids, and perhaps other neurolipids, are produced upon demand and are rapidly degraded. Therefore the cellular levels of endocannabinoids may be higher than those found in tissues. For instance, Biswas et al. have shown that AEA could reach up to 50  $\mu$ M inside the cells at the site of inflammation [59]. In addition, it has been shown that the so called “entourage effect” of endocannabinoids may lower the concentrations of *N*-acyl-dopamines required for a specific biological effect. Moreover NADA may bind to the albumin present in the fetal bovine serum and we have found that the concentrations of NADA required to induce HIF-1 $\alpha$  expression are sensibly lower in experiments performed in serum-free media.

Although the biosynthesis and catabolism of NADA is not completely understood, it has been suggested that fatty acid amide hydrolase (FAAH) and tyrosine hydroxylase mediate NADA biosynthesis and catechol-*O*-methyl transferase (COMT) regulates its catabolism [58]. However, it has been found that in hepatic stellate cells FAAH plays a role in NADA degradation rather than in NADA synthesis [8]. In addition, sulfation of *N*-acyl-dopamines in rat liver and nervous system by

**Fig. 7.** SIAH2 phosphorylation is not affected by NADA. (A–B) HEK-293T cells were transfected with Flag-SIAH2 and HA-SIAH2 (or SIAH2 Ring Mutant, RM) treated with 10  $\mu$ M NADA for 10 h before lysis. A fraction was subjected to immunoprecipitation (IP) using anti-HA antibody. After elution Flag-SIAH2 protein was detected by western blotting. The remaining extract fraction was tested for the occurrence of the indicated proteins by immunoblot (INPUT). (C) HEK-293T cells were incubated with PI3K inhibitor LY 294002 (10  $\mu$ M) 30 min before stimulation with NADA (10  $\mu$ M) for 6 h before lysis. Protein expression was evaluated by immunoblotting with the indicated antibodies. (D) HEK-293T cells were transfected with expression vectors encoding Flag-SIAH2 and the variant mutants Flag-SIAH2-5A and Flag-SIAH2-5D. After 36 h, cells were stimulated with NADA (10  $\mu$ M) for 10 h, lysed and protein expression evaluated by immunoblot with the indicated antibodies. (E) HEK-293T cells were transfected with the indicated plasmids, and after 36 h treated with 10  $\mu$ M NADA for 10 h, and lysed and protein expression was evaluated by immunoblot with the indicated antibodies. SIAH2 phosphorylation was seen by the upshifted band. The positions and molecular weights (in kDa) are indicated. (F) HEK-293T cells were transfected with the indicated plasmids, and after 36 h treated with 10  $\mu$ M NADA for 10 h, lysed and protein expression was evaluated by immunoblot with the indicated antibodies. (G) MO3.13 cells were stimulated with NADA (+, 1  $\mu$ M; ++, 10  $\mu$ M) for 6 h and analyzed for HIPK2 and DYRK2 expression as shown. We show a representative blot out of three independent experiments. The values below the gels indicate DYRK2 and HIPK2 protein signal intensities (quantified using ImageJ) after normalization to actin signal intensities.





**Table 1**  
Genes involved in the hypoxia response pathway altered by NADA stimulation.

Gene	Name	Fold induction
<i>HMOX1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	28.09
<i>NDRG1</i>	N-myc downstream regulated 1	25.67
<i>PFKFB4</i>	6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	6.60
<i>ANGPTL4</i>	Angiopoietin-like 4	6.33
<i>HK2</i>	Hexokinase 2	5.74
<i>SLC2A3</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	5.43
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	4.97
<i>SLC2A1</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	4.48
<i>SLC16A3</i>	Solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	4.15
<i>PKD1</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	3.98
<i>ERO1L</i>	ERO1-like (S. cerevisiae)	3.90
<i>MXI1</i>	MAX interactor 1	3.64
<i>CA9</i>	Carbonic anhydrase IX	3.54
<i>DDIT4</i>	DNA-damage-inducible transcript 4	3.34
<i>BNIP3</i>	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3	3.08
<i>EGR1</i>	Early growth response 1	−3.27
<i>EDN1</i>	Endothelin 1	−3.65
<i>FOS</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	−5.34

arylsulfotransferases (ASTs) has been investigated as the putative catabolic pathway for those endolipids, also suggesting that their catabolism may be different in distinct tissues [60]. Since we have identified specific genes upregulated by NADA in primary astrocytes we are currently investigating in vivo if the treatment with FAAH, COMT or AST inhibitors can induce the expression of such genes with the aim of validating surrogate markers for the action of *N*-acyl-dopamines in brain and liver.

In summary, this study offers a new mechanism of action for *N*-acyl-dopamines with important consequences on the hypoxia response and the control of angiogenesis in a neuronal context. We demonstrate how NADA can modulate SIAH2 activity, affecting the stability of some substrates including PHD3, HIPK2 and DYRK2. PHD3 inhibition affects the expression of the transcription factor HIF-1 $\alpha$ , which promoted the expression of genes such as EPO, VEGFA, HMOX1, HK2 and BNIP3 that are involved in angiogenesis, neuroprotection and cell survival. The potential pharmacological modulation of *N*-acyl-dopamines opens the door to the development of new therapies with important implications in the prevention of processes such as brain ischemia and neurodegenerative disorders.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.07.005>.

#### Authors' contributions

RS, ML and VG performed the experiments and collect data; MAC and EM designed the study, wrote the manuscript and approved the final version to be published. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

We thank Dr. David Bowtell and Dr. Andreas Möller for SIAH knock-out MEFs and Dr. M. L. Schmitz for the anti-HIPK2 antibody. This work was supported by MICINN (SAF2010-17122) and Consejería de Salud

(Junta de Andalucía) (PI-0650-2010 and PI-0246-2013) grants to M.A.C., and by MICINN (SAF2010-19292) and Junta de Andalucía (P09-CTS-4973) grants to E.M. Finally, we acknowledge Carmen Cabrero-Doncel for her assistance with the article.

#### References

- [1] M. Connor, C.W. Vaughan, R.J. Vandenberg, *N*-acyl amino acids and *N*-acyl neurotransmitter conjugates: neuromodulators and probes for new drug targets, *Br. J. Pharmacol.* 160 (2010) 1857–1871.
- [2] S.M. Huang, T. Bisogno, M. Trevisani, A. Al-Hayani, L. De Petrocellis, F. Fezza, M. Tognetto, T.J. Petros, J.F. Krey, C.J. Chu, J.D. Miller, S.N. Davies, P. Geppetti, J.M. Walker, V. Di Marzo, An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 8400–8405.
- [3] A. Toth, N. Keddi, Y. Wang, P.M. Blumberg, Arachidonoyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat, *Life Sci.* 73 (2003) 487–498.
- [4] T. Bisogno, D. Melck, M. Bobrov, N.M. Gretskaya, V.V. Bezuglov, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, *N*-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabinomimetic activity in vitro and in vivo, *Biochem. J.* 351 (Pt 3) (2000) 817–824.
- [5] C.J. Chu, S.M. Huang, L. De Petrocellis, T. Bisogno, S.A. Wong, J.D. Miller, R.E. Zupkin, N. Daddario, G. Appendino, V. Di Marzo, J.M. Walker, *N*-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13633–13639.
- [6] S. Harrison, L. De Petrocellis, M. Trevisani, F. Benvenuti, M. Bifulco, P. Geppetti, V. Di Marzo, Capsaicin-like effects of *N*-arachidonoyl-dopamine in the isolated guinea pig bronchi and urinary bladder, *Eur. J. Pharmacol.* 475 (2003) 107–114.
- [7] S.E. O'Sullivan, D.A. Kendall, M.D. Randall, Characterisation of the vasorelaxant properties of the novel endocannabinoid *N*-arachidonoyl-dopamine (NADA), *Br. J. Pharmacol.* 141 (2004) 803–812.
- [8] A. Wojtalla, F. Herweck, M. Granzow, S. Klein, J. Trebicka, S. Huss, R. Lerner, B. Lutz, F.A. Schildberg, P.A. Knolle, T. Sauerbruch, M.V. Singer, A. Zimmer, S.V. Siegmund, The endocannabinoid *N*-arachidonoyl dopamine (NADA) selectively induces oxidative stress-mediated cell death in hepatic stellate cells but not in hepatocytes, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302 (2012) G873–G887.
- [9] R. Sancho, A. Macho, L. de la Vega, M.A. Calzado, B.L. Fiebich, G. Appendino, E. Munoz, Immunosuppressive activity of endovanilloids: *N*-arachidonoyl-dopamine inhibits activation of the NF- $\kappa$ B, NFAT, and activator protein 1 signaling pathways, *J. Immunol.* 172 (2004) 2341–2351.
- [10] M.Y. Bobrov, A.A. Lizhin, E.L. Adrianova, N.M. Gretskaya, L.E. Frumkina, L.G. Khaspekov, V.V. Bezuglov, Antioxidant and neuroprotective properties of *N*-arachidonoyldopamine, *Neurosci. Lett.* 431 (2008) 6–11.
- [11] C.M. Navarrete, B.L. Fiebich, A.G. de Vinuesa, S. Hess, A.C. de Oliveira, E. Candelario-Jalil, F.J. Caballero, M.A. Calzado, E. Munoz, Opposite effects of anandamide and *N*-arachidonoyl dopamine in the regulation of prostaglandin E and 8-iso-PGF formation in primary glial cells, *J. Neurochem.* 109 (2009) 452–464.
- [12] R. Sancho, L. de la Vega, A. Macho, G. Appendino, V. Di Marzo, E. Munoz, Mechanisms of HIV-1 inhibition by the lipid mediator *N*-arachidonoyldopamine, *J. Immunol.* 175 (2005) 3990–3999.
- [13] C.M. Navarrete, M. Perez, A.G. de Vinuesa, J.A. Collado, B.L. Fiebich, M.A. Calzado, E. Munoz, Endogenous *N*-acyl-dopamines induce COX-2 expression in brain endothelial cells by stabilizing mRNA through a p38 dependent pathway, *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010) 1805–1814.
- [14] S.D. Skaper, V. Di Marzo, Endocannabinoids in nervous system health and disease: the big picture in a nutshell, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 367 (2012) 3193–3200.
- [15] R.E. Speer, S.S. Karuppagounder, M. Basso, S.F. Sleiman, A. Kumar, D. Brand, N. Smirnova, I. Gazaryan, S.J. Khim, R.R. Ratan, Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases as targets for neuroprotection by “antioxidant” metal chelators: from ferroptosis to stroke, *Free Radic. Biol. Med.* 62 (2013) 26–36.
- [16] G.L. Semenza, Life with oxygen, *Science* 318 (2007) 62–64.
- [17] J. Frasor, J.M. Danes, C.C. Funk, B.S. Katzenellenbogen, Estrogen down-regulation of the corepressor N-CoR: mechanism and implications for estrogen derepression of N-CoR-regulated genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 13153–13157.
- [18] G.L. Semenza, HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus, *Cell* 107 (2001) 1–3.
- [19] P. Jaakkola, D.R. Mole, Y.M. Tian, M.I. Wilson, J. Gielbert, S.J. Gaskell, A. von Kriegsheim, H.F. Hebestreit, M. Mukherji, C.J. Schofield, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation, *Science* 292 (2001) 468–472.
- [20] M. Ivan, K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J.M. Asara, W.S. Lane, W.G. Kaelin Jr., HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing, *Science* 292 (2001) 464–468.

**Fig. 8.** Functional consequences of NADA on the hypoxia response pathway. (A) Human primary astrocytes were stimulated with NADA (10  $\mu$ M) for 6 h and the expression analysis of genes involved in the human hypoxia signaling pathway determined by PCR array. Heat maps show the significantly upregulated (green) and downregulated (red) genes in NADA-treated cells compared with control. (B) Primary astrocytes were exposed to NADA, hypoxia or both for 6 h and the expression of KH2, BNIP3, HMOX1 and VEGF mRNAs analyzed by qPCR. Data are mean  $\pm$  SD of *n* = 3 experiments. \**P* < 0.0001. (C) SK-N-SH cells were stimulated or not with NADA (10  $\mu$ M) for 3 h, and then subjected or not to hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 3 h as indicated. Cell viability was examined by MTT assay. Data are mean  $\pm$  SD of *n* = 4 experiments. \*\*\**P* = 0.0036. HUVECs (D) or HBMECs (E) were plated on Matrigel-coated culture dishes and treated with NADA (10  $\mu$ M) for 24 h. Quantitative analysis of tube formation was performed in a BD Pathway 855 Bioimager using Attovision v 1.7 BD software. (D) Data are mean  $\pm$  SD of *n* = 3 experiments. \*\**P* = 0.0029, \*\*\**P* = 0.0002 (E) Data are mean  $\pm$  SD of *n* = 3 experiments. \*\**P* = 0.0017.

- [21] N. Masson, C. Willam, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation, *EMBO J.* 20 (2001) 5197–5206.
- [22] W.C. Hon, M.I. Wilson, K. Harlos, T.D. Claridge, C.W. Pugh, P.H. Maxwell, P.J. Ratcliffe, D.I. Stuart, E.Y. Jones, Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1  $\alpha$  by pVHL, *Nature* 417 (2002) 975–978.
- [23] K. Nakayama, I.J. Frew, M. Hagensen, M. Skals, H. Habelhah, A. Bhoumik, T. Kadoya, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, P.B. Frappell, D.D. Bowtell, Z. Ronai, Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 $\alpha$  abundance, and modulates physiological responses to hypoxia, *Cell* 117 (2004) 941–952.
- [24] A. Moller, C.M. House, C.S. Wong, D.B. Scanlon, M.C. Liu, Z. Ronai, D.D. Bowtell, Inhibition of Siah ubiquitin ligase function, *Oncogene* 28 (2009) 289–296.
- [25] G. Hu, Y.L. Chung, T. Glover, V. Valentine, A.T. Look, E.R. Fearon, Characterization of human homologs of the *Drosophila* seven in absentia (sina) gene, *Genomics* 46 (1997) 103–111.
- [26] K.L. Lorick, J.P. Jensen, S. Fang, A.M. Ong, S. Hatakeyama, A.M. Weissman, RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 11364–11369.
- [27] J.D. Schnell, L. Hicke, Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 35857–35860.
- [28] A.H. Tang, T.P. Neufeld, E. Kwan, G.M. Rubin, PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism, *Cell* 90 (1997) 459–467.
- [29] M.A. Calzado, L. de la Vega, A. Moller, D.D. Bowtell, M.L. Schmitz, An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response, *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 85–91.
- [30] S. Li, C. Xu, R.W. Carthew, Phyllopod acts as an adaptor protein to link the sina ubiquitin ligase to the substrate protein tramtrack, *Mol. Cell Biol.* 22 (2002) 6854–6865.
- [31] S.I. Matsuzawa, J.C. Reed, Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses, *Mol. Cell* 7 (2001) 915–926.
- [32] T.R. Sarkar, S. Sharan, J. Wang, S.A. Pawar, C.A. Cantwell, P.F. Johnson, D.K. Morrison, J.M. Wang, E. Sterneck, Identification of a Src tyrosine kinase/SIAH2 E3 ubiquitin ligase pathway that regulates C/EBP $\delta$  expression and contributes to transformation of breast tumor cells, *Mol. Cell Biol.* 32 (2012) 320–332.
- [33] M. Fanelli, A. Fantozzi, P. De Luca, S. Caprodossi, S. Matsuzawa, M.A. Lazar, P.G. Pelicci, S. Minucci, The coiled-coil domain is the structural determinant for mammalian homologues of *Drosophila* Sina-mediated degradation of promyelocytic leukemia protein and other tripartite motif proteins by the proteasome, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 5374–5379.
- [34] H.L. Zhao, N. Ueki, M.J. Hayman, The Ski protein negatively regulates Siah2-mediated HDAC3 degradation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399 (2010) 623–628.
- [35] M. Perez, C. Garcia-Limones, I. Zapico, A. Marina, M.L. Schmitz, E. Munoz, M.A. Calzado, Mutual regulation between SIAH2 and DYRK2 controls hypoxic and genotoxic signaling pathways, *J. Mol. Cell Biol.* 4 (2012) 316–330.
- [36] L. Topol, X. Jiang, H. Choi, L. Garrett-Beal, P.J. Carolan, Y. Yang, Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation, *J. Cell Biol.* 162 (2003) 899–908.
- [37] W. Xie, L. Jin, Y. Mei, M. Wu, E2F1 represses beta-catenin/TCF activity by direct up-regulation of Siah1, *J. Cell. Mol. Med.* 13 (2009) 1719–1727.
- [38] Y. Liao, M. Zhang, B. Lonnerdal, Growth factor TGF- $\beta$  induces intestinal epithelial cell (IEC-6) differentiation: miR-146b as a regulatory component in the negative feedback loop, *Genes Nutr.* 8 (2013) 69–78.
- [39] G. Hu, E.R. Fearon, Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins, *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) 724–732.
- [40] A. Khurana, K. Nakayama, S. Williams, R.J. Davis, T. Mustelin, Z. Ronai, Regulation of the ring finger E3 ligase Siah2 by p38 MAPK, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35316–35326.
- [41] J.L. Stebbins, E. Santelli, Y. Feng, S.K. De, A. Purves, K. Motamedchaboki, B. Wu, Z.A. Ronai, R.C. Liddington, M. Pellecchia, Structure-based design of covalent Siah inhibitors, *Chem. Biol.* 20 (2013) 973–982.
- [42] M. Shah, J.L. Stebbins, A. Dewing, J. Qi, M. Pellecchia, Z.A. Ronai, Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadiolone) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis, *Pigment Cell Melanoma Res.* 22 (2009) 799–808.
- [43] L. de la Vega, J. Hornung, E. Kremmer, M. Milanovic, M.L. Schmitz, Homeodomain-interacting protein kinase 2-dependent repression of myogenic differentiation is relieved by its caspase-mediated cleavage, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 5731–5745.
- [44] I.N. Bojesen, H.S. Hansen, Binding of anandamide to bovine serum albumin, *J. Lipid Res.* 44 (2003) 1790–1794.
- [45] K. Nakayama, J. Qi, Z. Ronai, The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2009) 443–451.
- [46] P. Carmeliet, Y. Dor, J.M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C.J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R.K. Jain, D. Collen, E. Keshert, Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis, *Nature* 394 (1998) 485–490.
- [47] A. Yamaguchi, M. Taniguchi, O. Hori, S. Ogawa, N. Tojo, N. Matsuoka, S. Miyake, K. Kasai, H. Sugimoto, M. Tamatani, T. Yamashita, M. Tohyama, Peg3/Pw1 is involved in p53-mediated cell death pathway in brain ischemia/hypoxia, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 623–629.
- [48] J. Aragones, P. Fraisl, M. Baes, P. Carmeliet, Oxygen sensors at the crossroad of metabolism, *Cell Metab.* 9 (2009) 11–22.
- [49] O.A. Harari, J.K. Liao, NF- $\kappa$ B and innate immunity in ischemic stroke, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1207 (2010) 32–40.
- [50] M. Winter, D. Sombroek, I. Dauth, J. Moehlenbrink, K. Scheuermann, J. Crone, T.G. Hofmann, Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR, *Nat. Cell Biol.* 10 (2008) 812–824.
- [51] A. Carlucci, A. Adornetto, A. Scorziello, D. Viggiano, M. Foca, O. Cuomo, L. Annunziato, M. Gottesman, A. Feliciello, Proteolysis of AKAP121 regulates mitochondrial activity during cellular hypoxia and brain ischaemia, *EMBO J.* 27 (2008) 1073–1084.
- [52] E.C. Yego, S. Mohr, Siah-1 Protein is necessary for high glucose-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase nuclear accumulation and cell death in Muller cells, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 3181–3190.
- [53] G. Fiucci, S. Beaucourt, D. Duflaut, A. Lespagnol, P. Stumtner-Cuvelette, A. Geant, G. Hofmayer, M. Tuynder, L. Susini, J.M. Lassalle, C. Wasylyk, B. Wasylyk, M. Oren, R. Amson, A. Telerman, Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 3510–3515.
- [54] R.J. MacLeod, M. Hayes, I. Pacheco, Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293 (2007) G403–G411.
- [55] A. Depaux, F. Regnier-Ricard, A. Germani, N. Varin-Blank, Dimerization of hSiah proteins regulates their stability, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348 (2006) 857–863.
- [56] M. Scortegagna, T. Subtil, J. Qi, H. Kim, W. Zhao, W. Gu, H. Kluger, Z.A. Ronai, USP13 enzyme regulates Siah2 ligase stability and activity via noncatalytic ubiquitin-binding domains, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 27333–27341.
- [57] I. Grishina, K. Debus, C. Garcia-Limones, C. Schneider, A. Shrestha, C. Garcia, M.A. Calzado, M.L. Schmitz, SIAH-mediated ubiquitination and degradation of acetyltransferases regulate the p53 response and protein acetylation, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 2287–2296.
- [58] S.S.-J. Hu, H.B. Bradshaw, V.M. Benton, J.S.-C. Chen, S.M. Huang, A. Minassi, T. Bisogno, K. Masuda, B. Tan, R. Roskoski Jr., The biosynthesis of *N*-arachidonoyl dopamine (NADA), a putative endocannabinoid and endovanilloid, via conjugation of arachidonic acid with dopamine, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 81 (2009) 291–301.
- [59] K.K. Biswas, K.P. Sarker, K. Abeyama, K. Kawahara, S. Iino, Y. Otsubo, K. Saigo, H. Izumi, T. Hashiguchi, M. Yamakuchi, Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis, *Hepatology* 38 (2003) 1167–1177.
- [60] M. Akimov, I. Nazimov, N. Gretskaya, G. Zinchenko, V. Bezuglov, Sulfation of *N*-acyl dopamines in rat tissues, *Biochem. Mosc.* 74 (2009) 681–685.