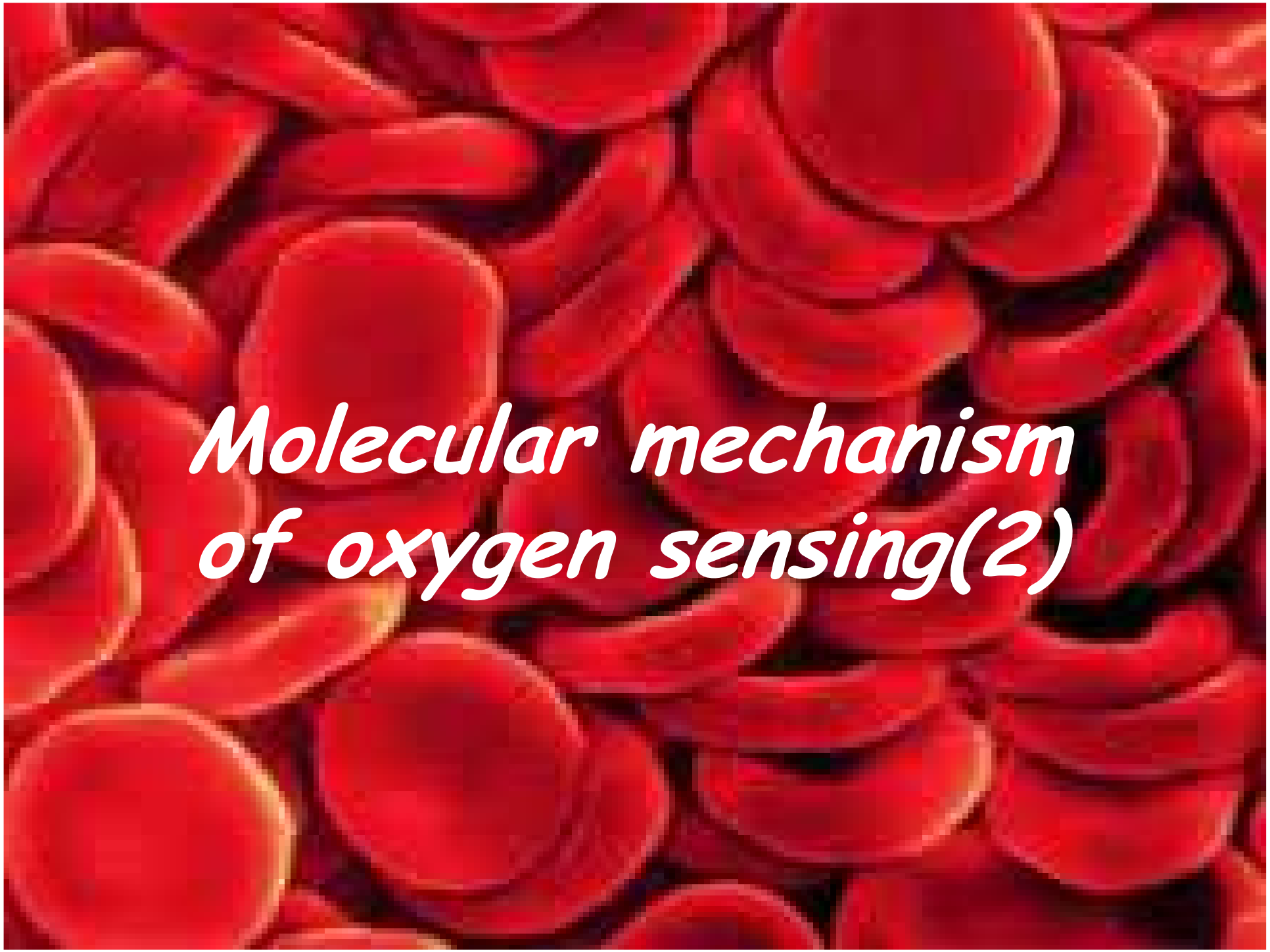
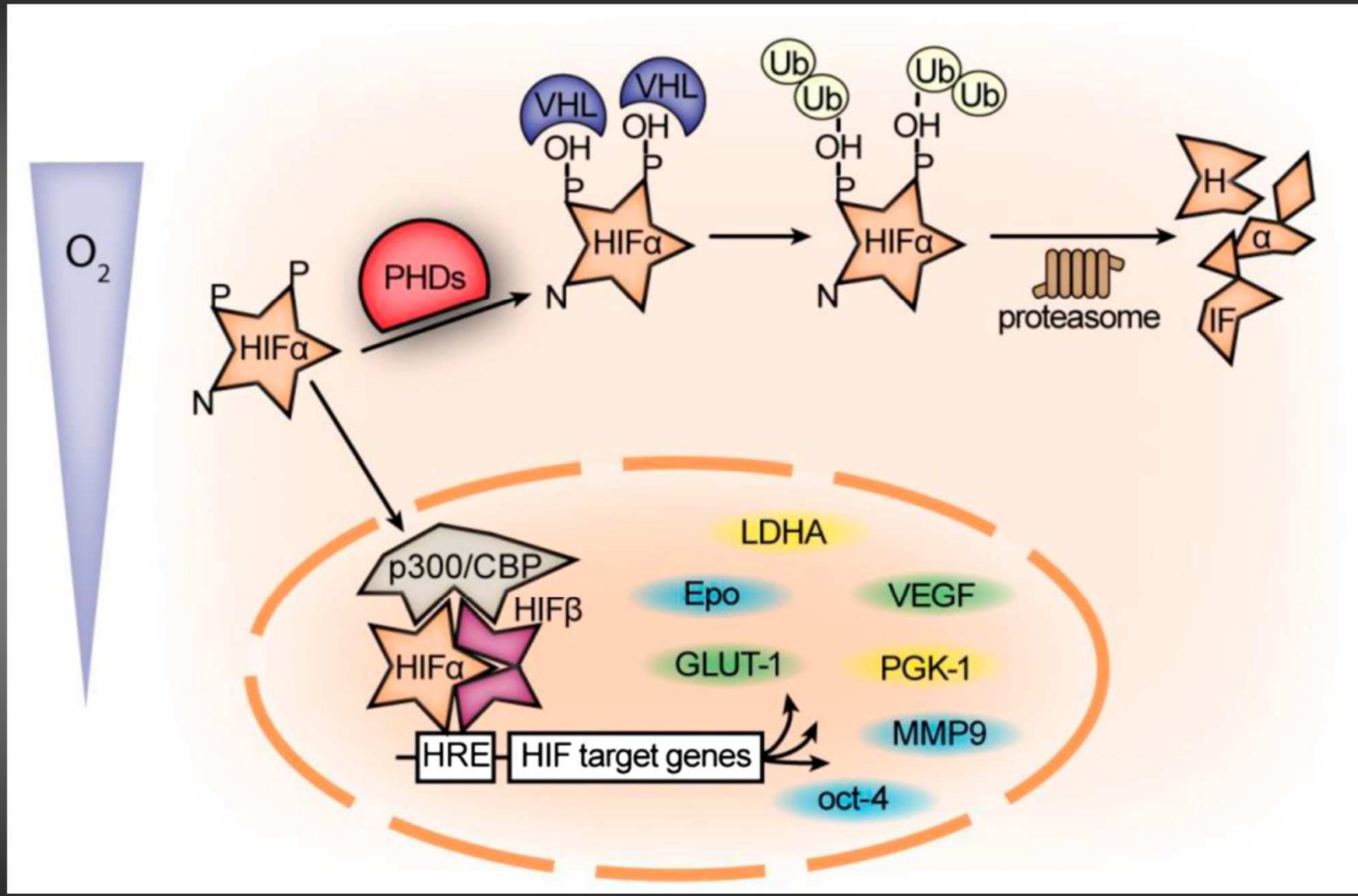
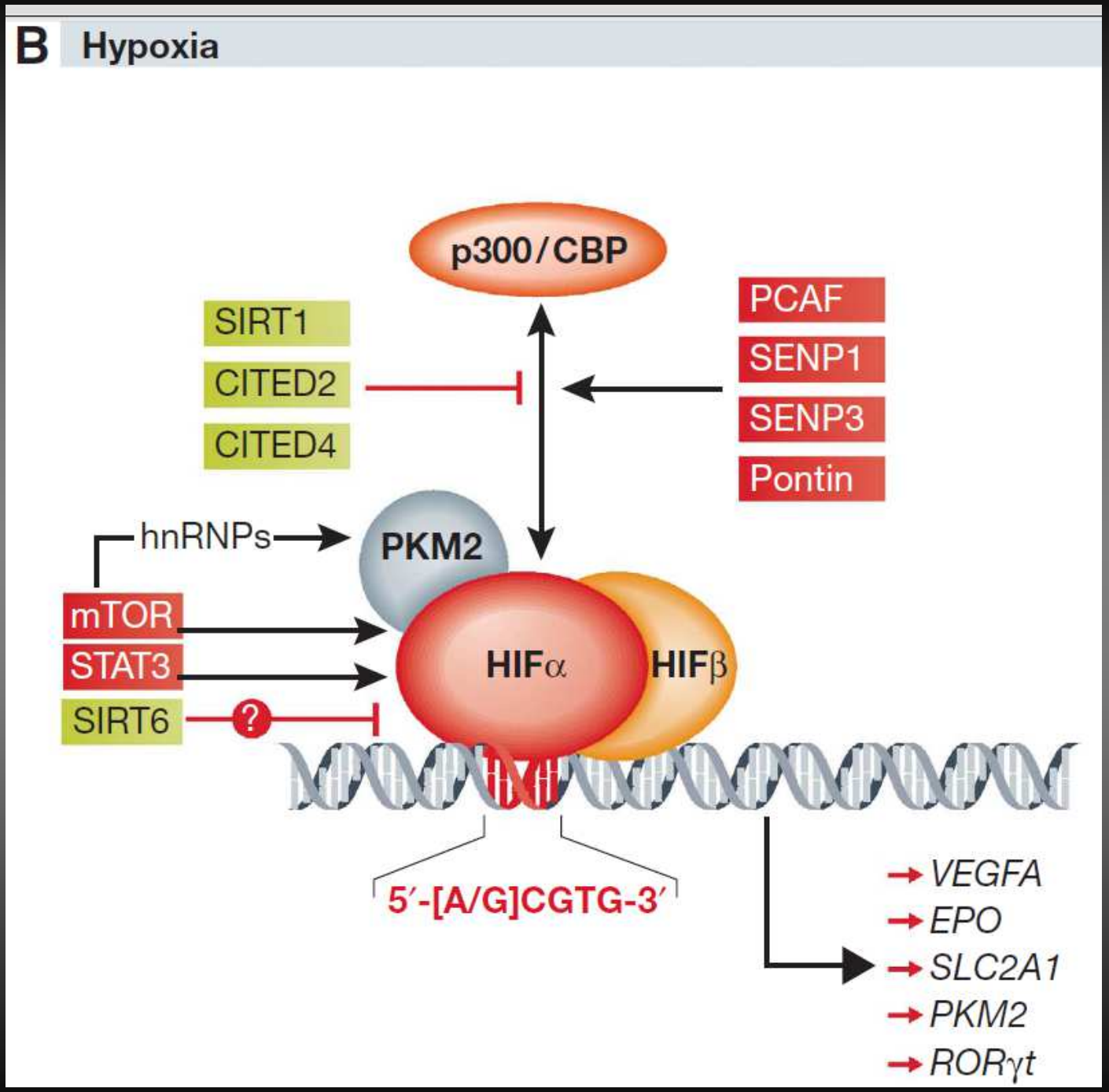
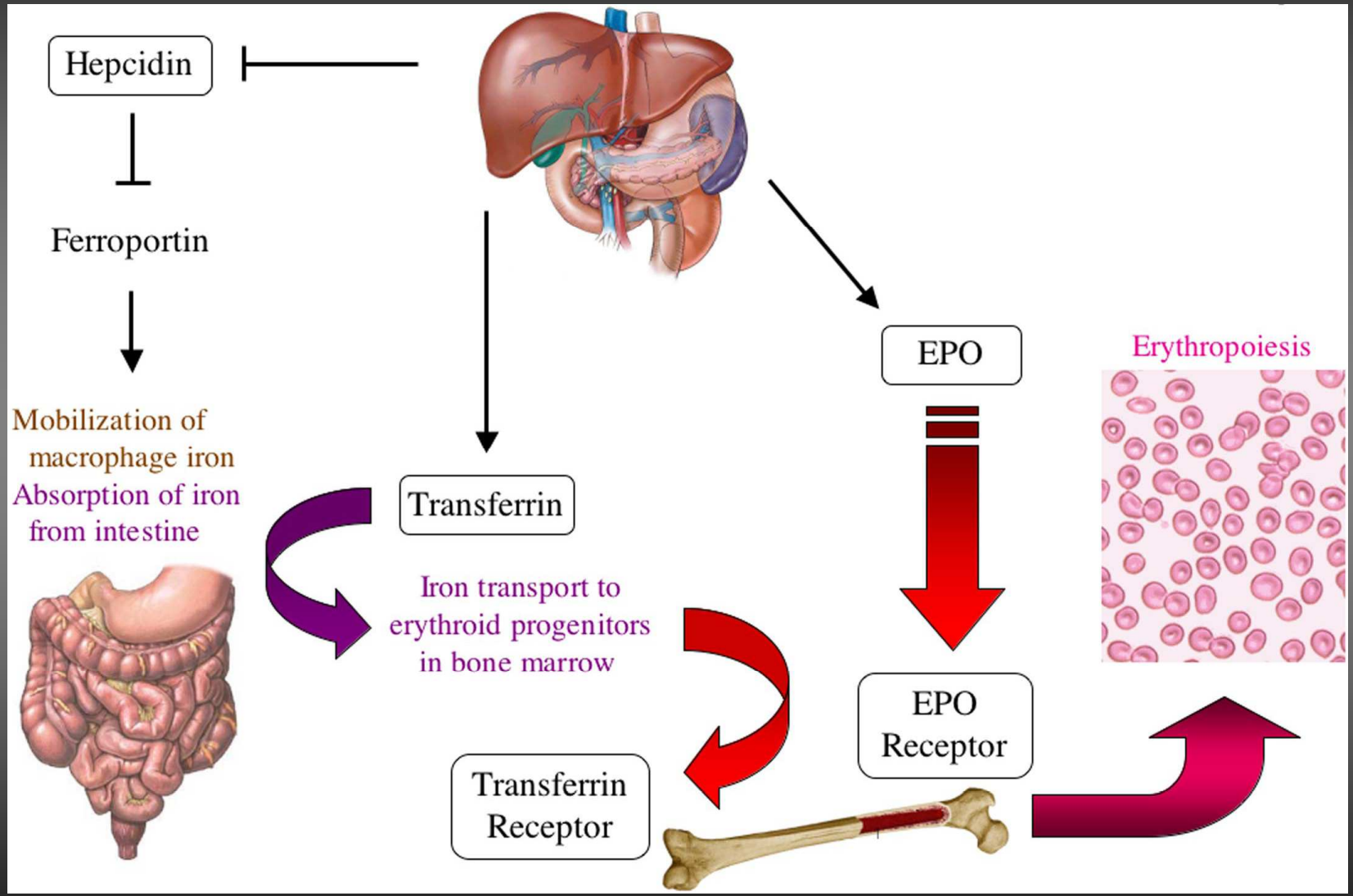

Molecular mechanism
of oxygen sensing(2)

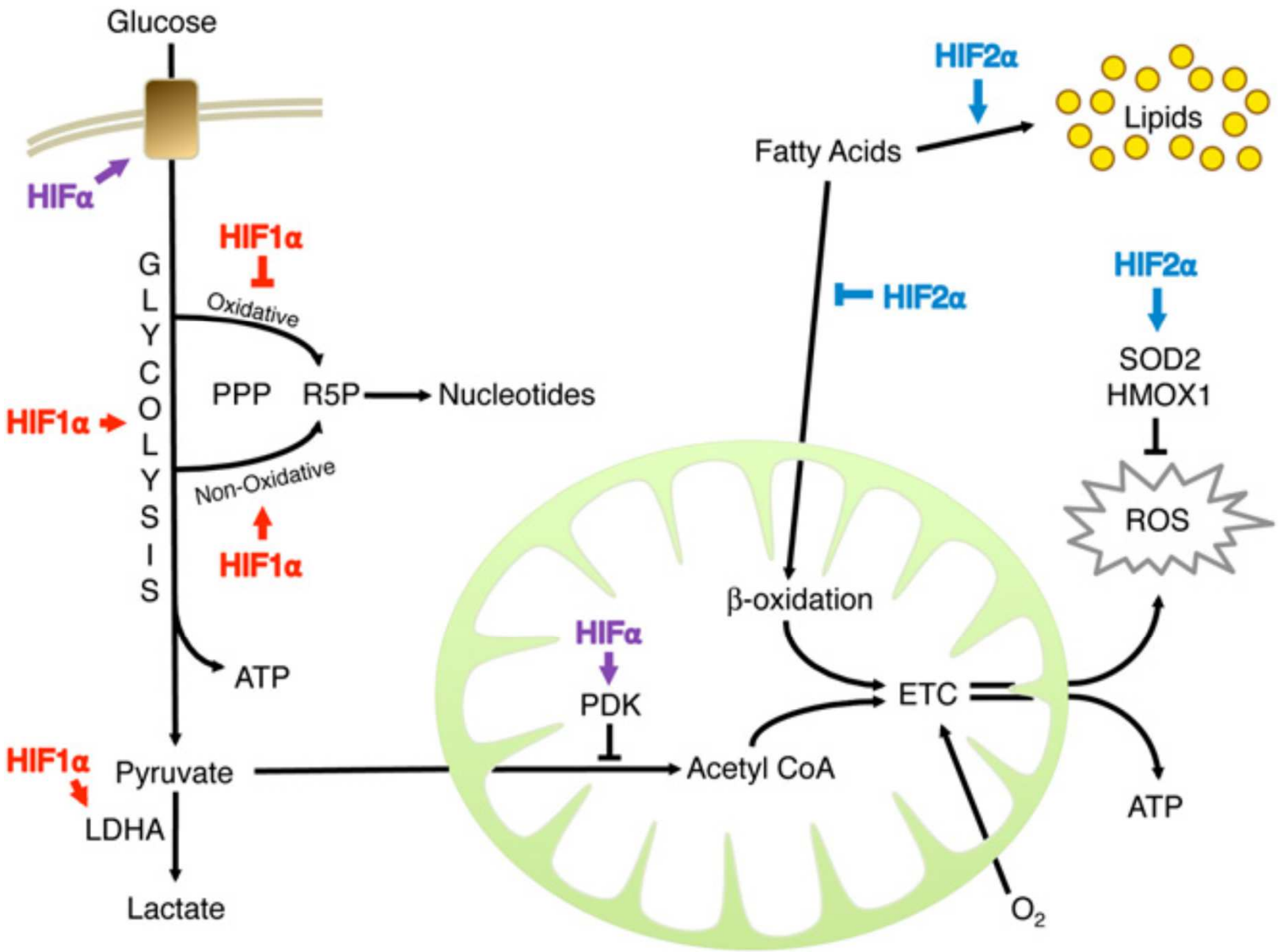

O2
HIFα
P
P
N
PHDs
VHL
VHL
OH
OH
P
P
HIFα
N
Ub
Ub
Ub
Ub
OH
OH
P
P
HIFα
N
proteasome
H
α
IF
p300/CBP
HIFβ
HIFα
HRE
HIF target genes
LDHA
Epo
VEGF
GLUT-1
PGK-1
MMP9
oct-4


B Hypoxia
p300/CBP
SIRT1
CITED2
CITED4
PCAF
SENP1
SENP3
Pontin
hnRNPs
PKM2
mTOR
STAT3
SIRT6
?
HIFα
HIFβ
5′-[A/G]CGTG-3′
VEGFA
EPO
SLC2A1
PKM2
RORγt

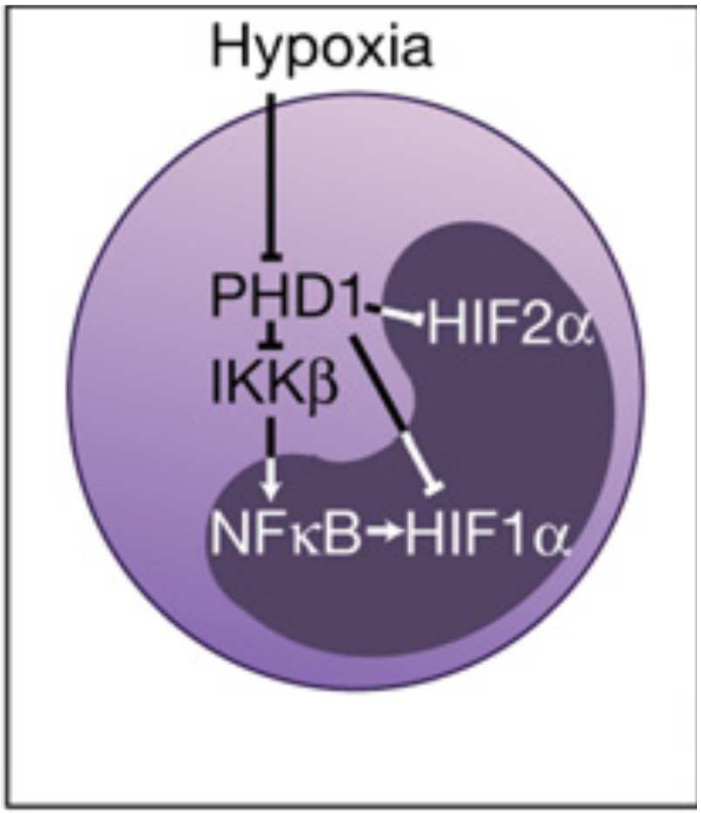
Response to hypoxia - chronic adaptation



HIFa Control of Cell Metabolism

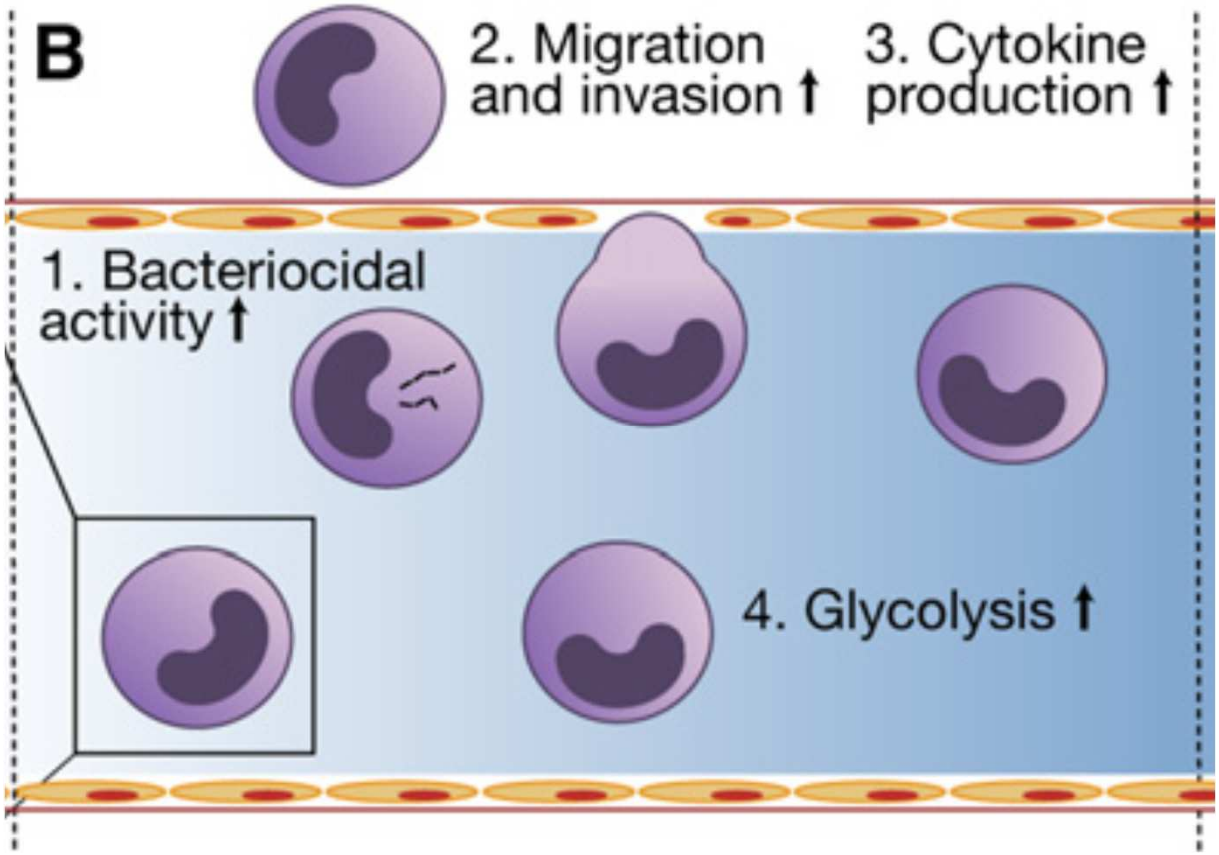


Macrophage and Vascular Responses to HIF



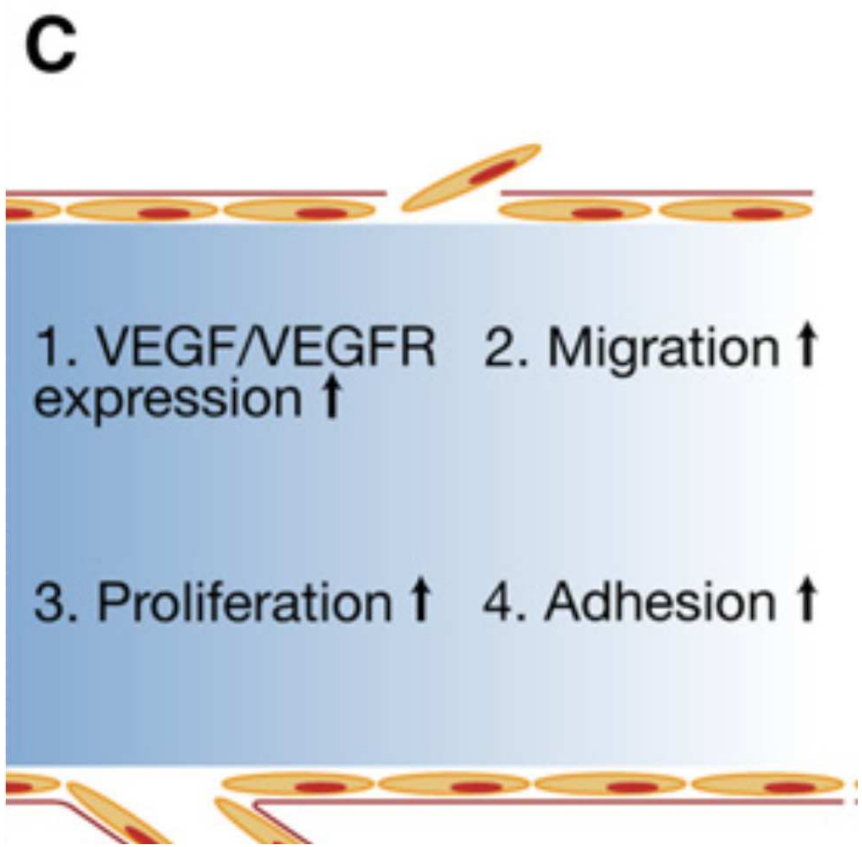
In addition to direct HIF stabilization, hypoxic inhibition of PHDs results in IKK-mediated degradation of the NFkB inhibitor IkB.
Activated NFkB directly transactivates HIF1a

Macrophage and Vascular Responses to HIF



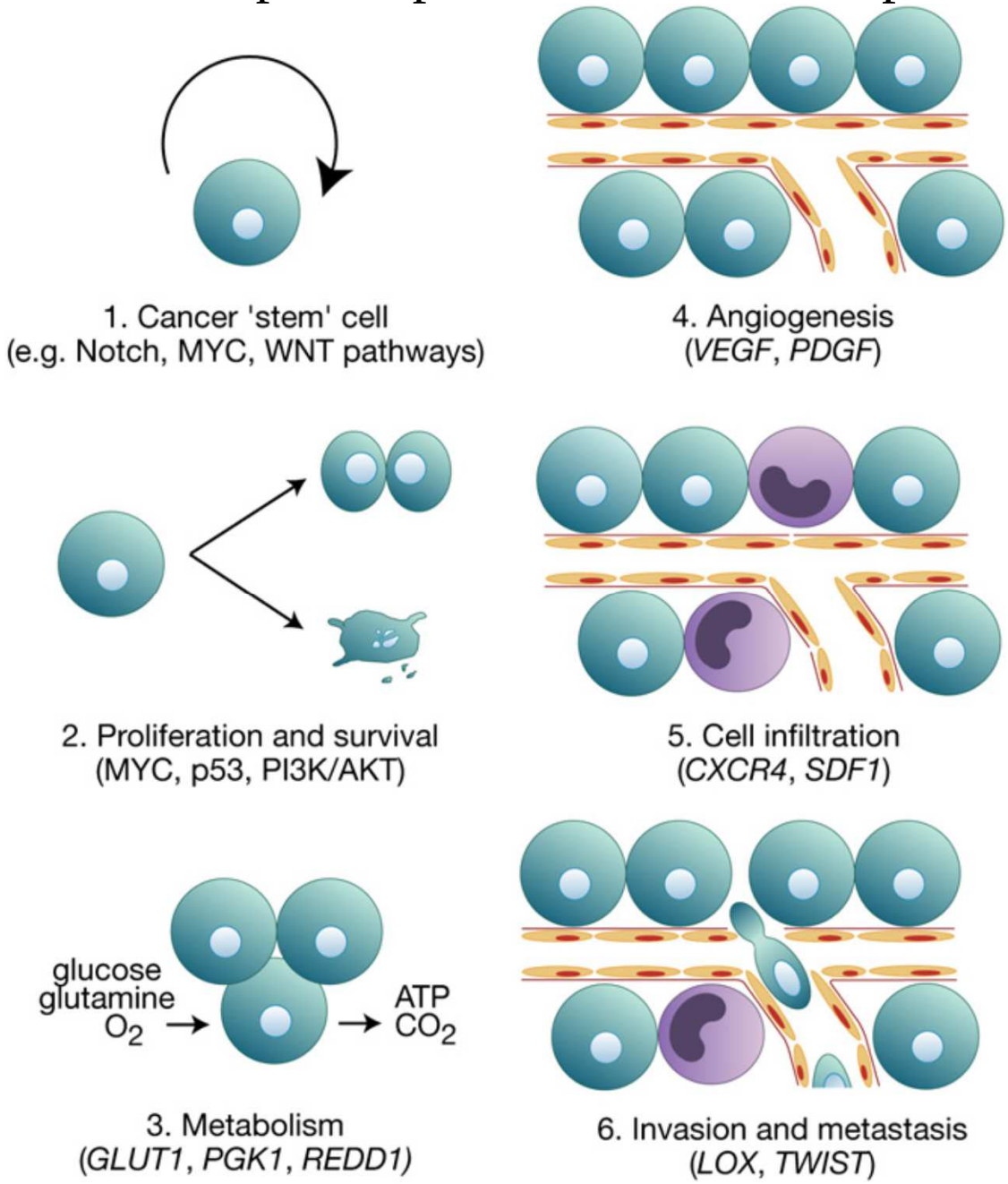
HIF activity is involved in multiple aspects of macrophage behavior via the induction of genes involved in (1) bacterial killing (NOS2),
(2) migration and invasion (CXCR4), (3) cytokine production (IL1b, IL6, IL12, TNFa), and (4) metabolism (GLUT1, PGK1).

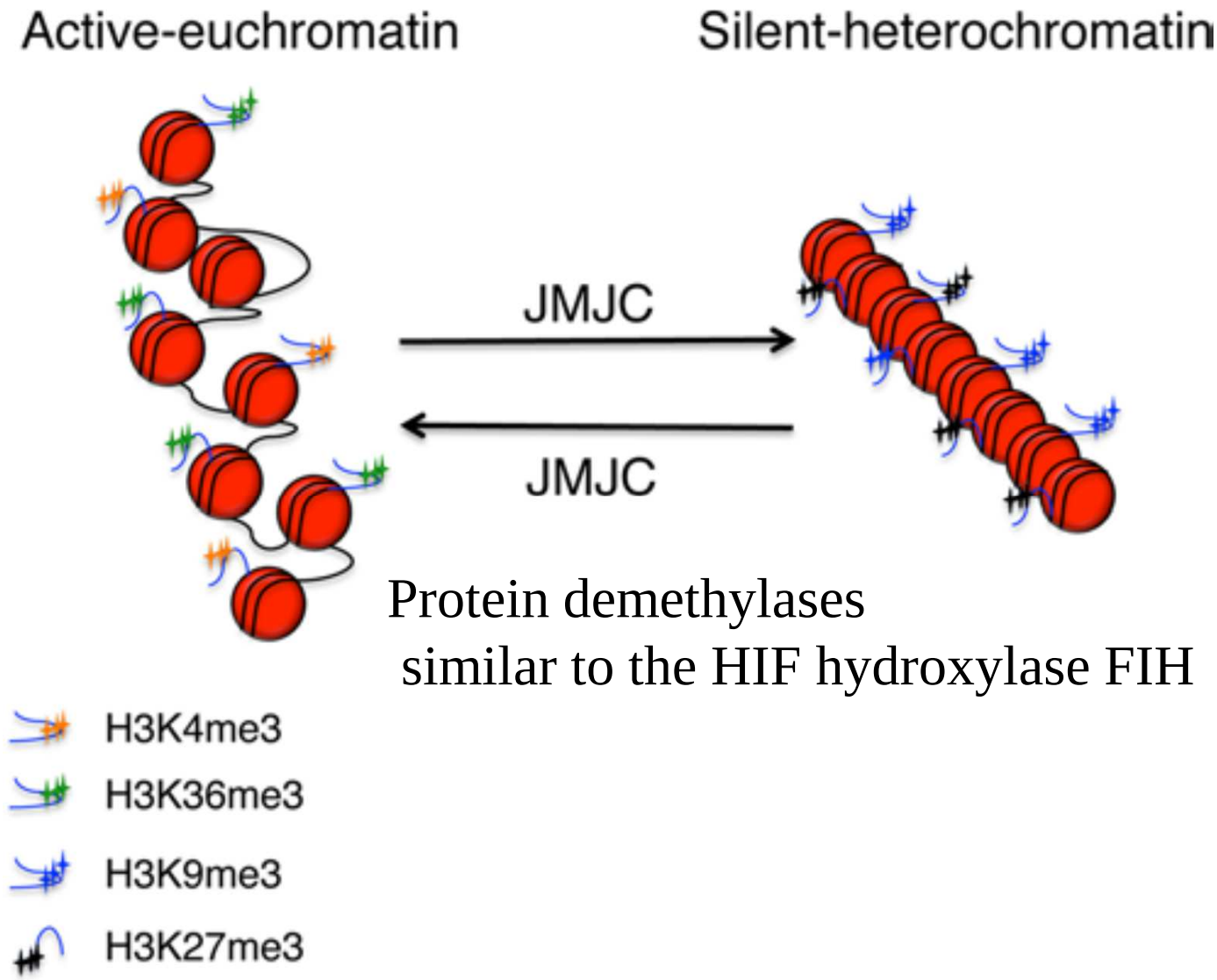
Vascular Responses to HIF: Endothelial Cells (Ecs)



HIF1a stabilization in ECs increases (1) VEGF expression, (2) migration, and (3) proliferation, whereas HIF2a stabilization promotes (4) EC adhesion to the extracellular matrix

Effects of HIF on Multiple Steps of Cancer Development





Protein demethylases
similar to the HIF hydroxylase FIH

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELL'ERITROPOIETINA DA PARTE DELL'IPOSSIA

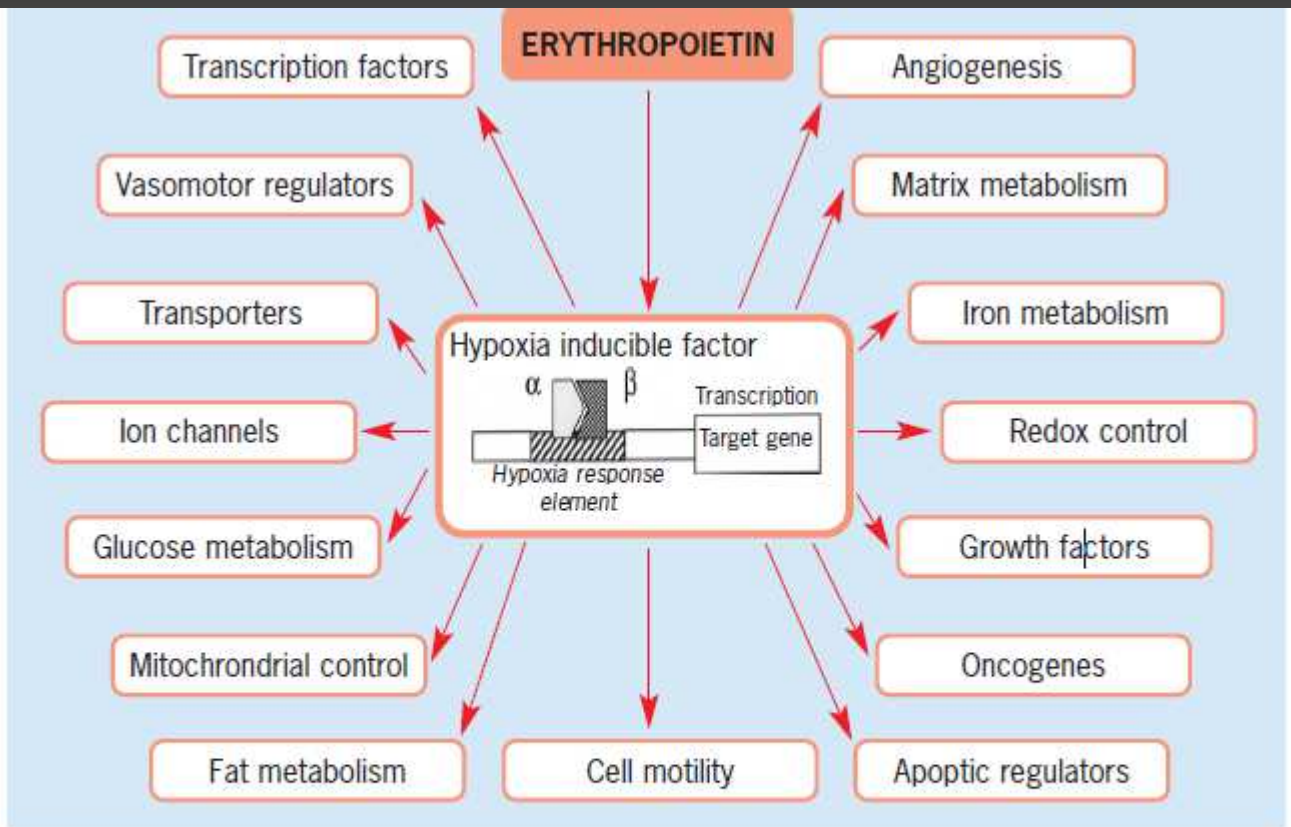
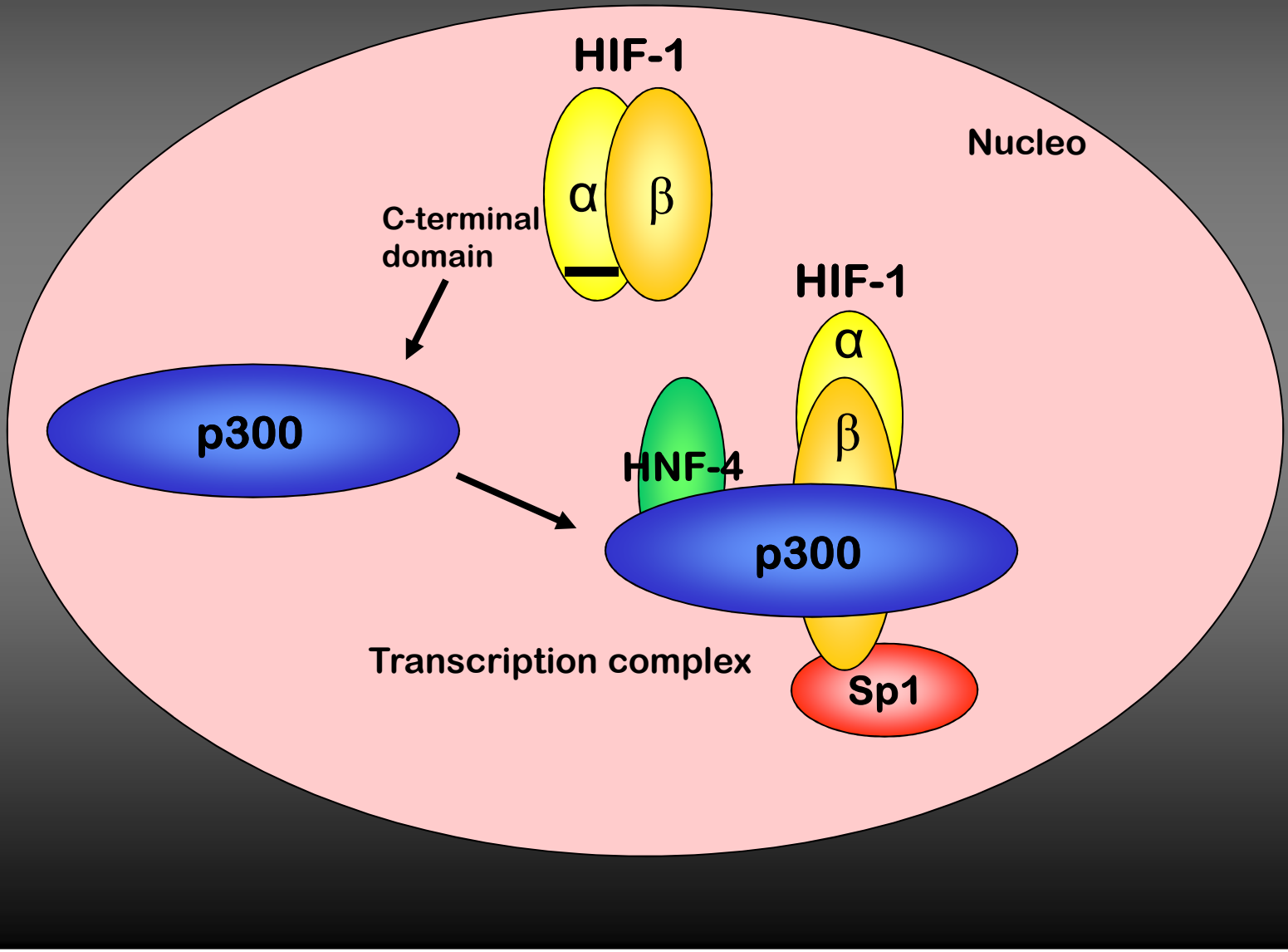
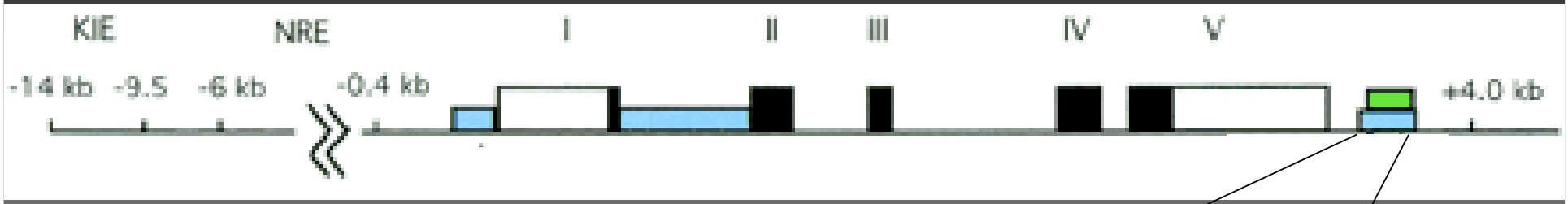


Fig 1. The hypoxia-inducible factor (HIF) transcriptional cascade directly regulates genes with key functions in a broad range of processes. The complex binds in a sequence-specific manner to control elements in DNA, termed hypoxia-response elements, at target gene loci.

Regolazione del gene Epo da parte dell'ipossia

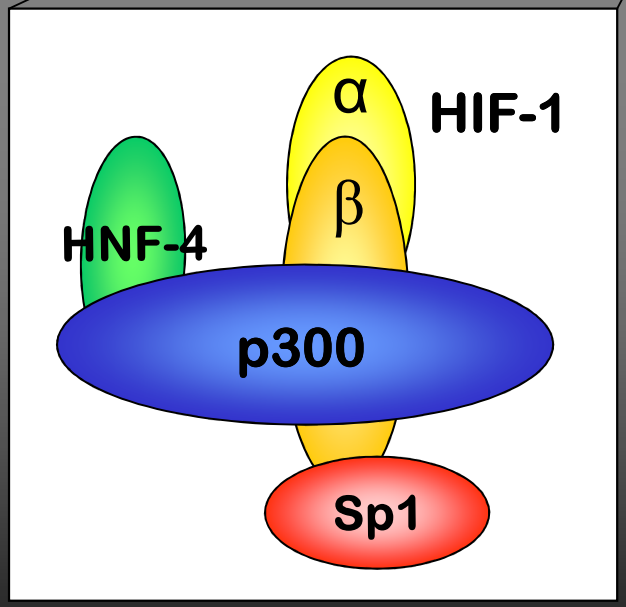


Regolazione del gene Epo da parte dell'ipossia

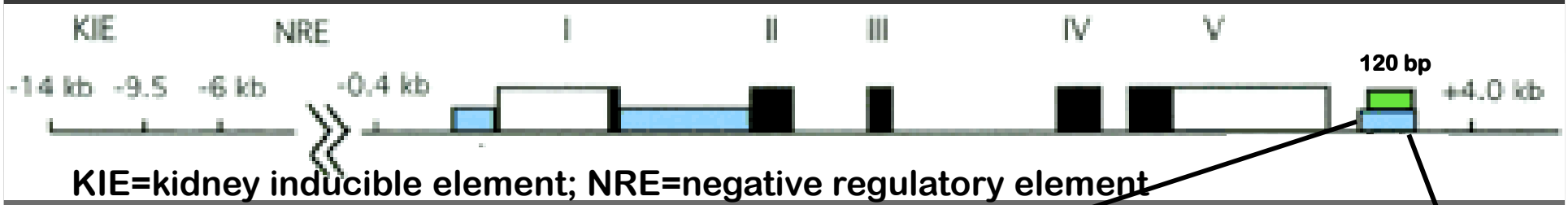


Promotore

Transcription complex



Regolazione del gene Epo da parte dell'ipossia



KIE=kidney inducible element; NRE=negative regulatory element

50 pb nella Regione 3'

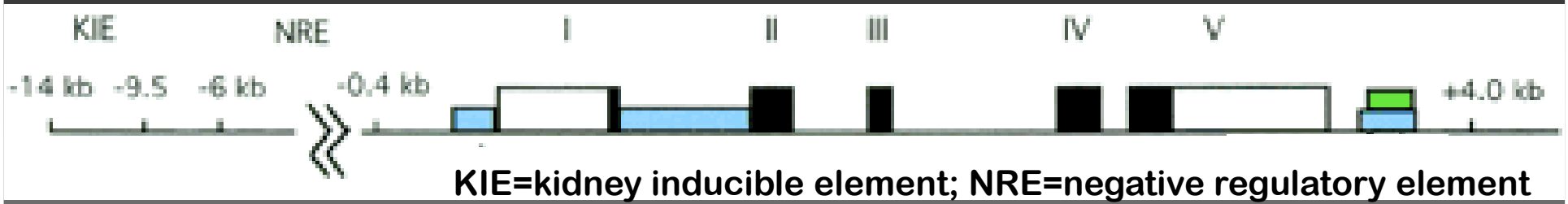
HNF-4 (Hepatocyte nuclear factor 4) fattore di trascrizione espresso nel cortex renale e nel fegato come Epo □ contribuisce alla regolazione tessuto-specifica

Sequenza di legame per *HIF-1*

Sequenza di legame per *HNF-4*

Mutazioni a carico di una di queste sequenze inibiscono l'induzione di Epo da parte dell'ipossia

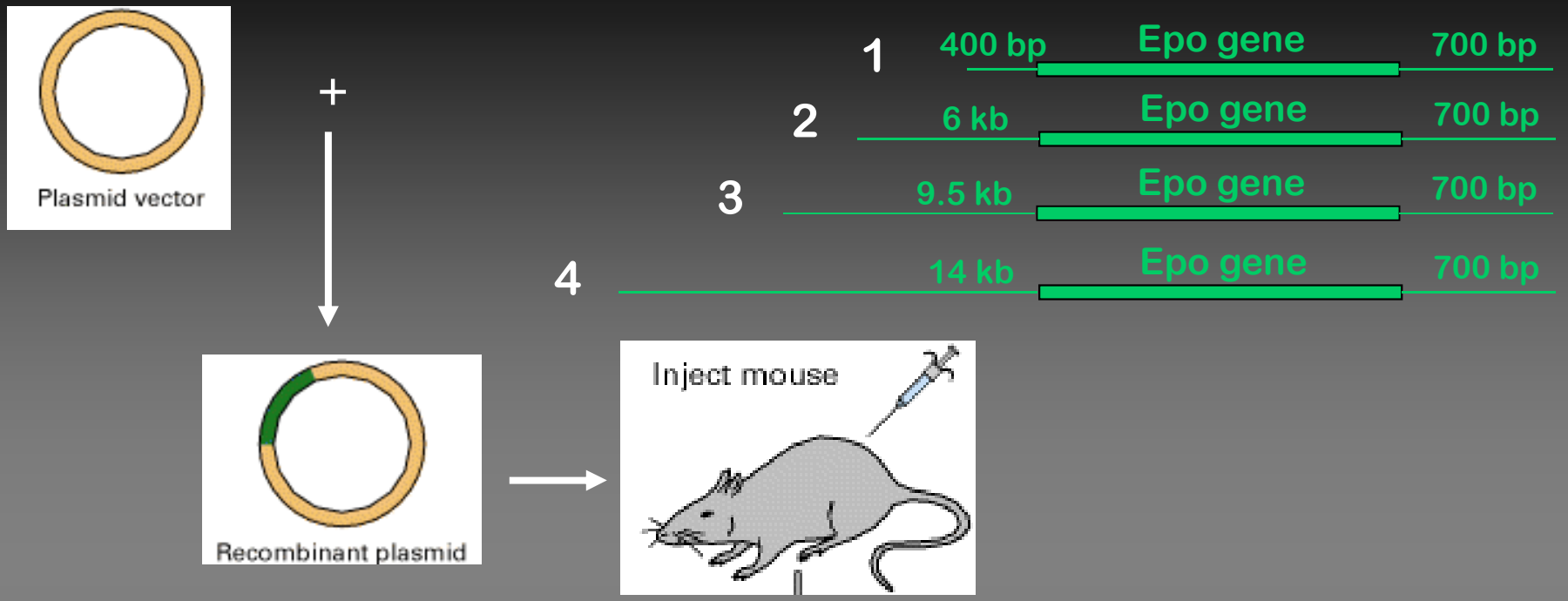
Regolazione tessuto-specifica del gene Epo



KIE=kidney inducible element; NRE=negative regulatory element

Regione 5'

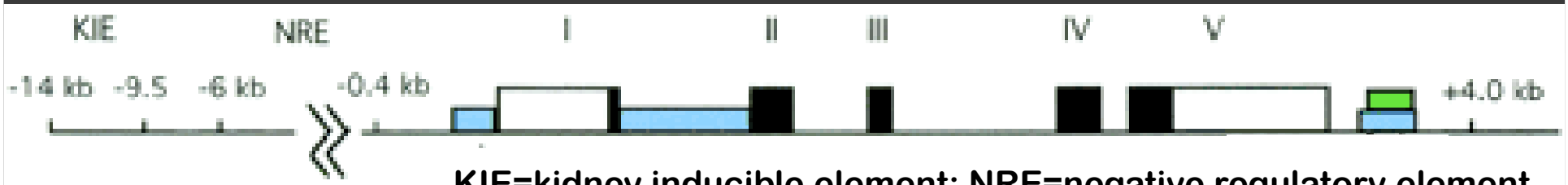
- 9.5-14 kb → Sequenza richiesta per l'espressione nel rene
- Entro le 9.5 kb → Sequenza richiesta per l'espressione nel fegato
- 0.4-6 kb → Sequenza regolatoria negativa che inibisce l'espressione di Epo nei tessuti che non producono Epo



1. Epo espressa in fegato, rene e tessuti che normalmente non esprimono Epo
2. Epo espresso nel fegato ma non nel rene → 400 bp-6 kb: sequenze regolatorie negative
3. Epo espresso nel fegato ma non nel rene → Entro le 9.5 kb: sequenze per l'espressione nel fegato
4. Epo espresso nel rene → 9.5-14 kb: sequenze per l'espressione nel rene

Semenza et al. PNAS 1989; Semenza et al., Mol Cell Biol. 1990; Semenza et al., PNAS 1991

Regolazione tessuto-specifica del gene Epo



KIE=kidney inducible element; NRE=negative regulatory element

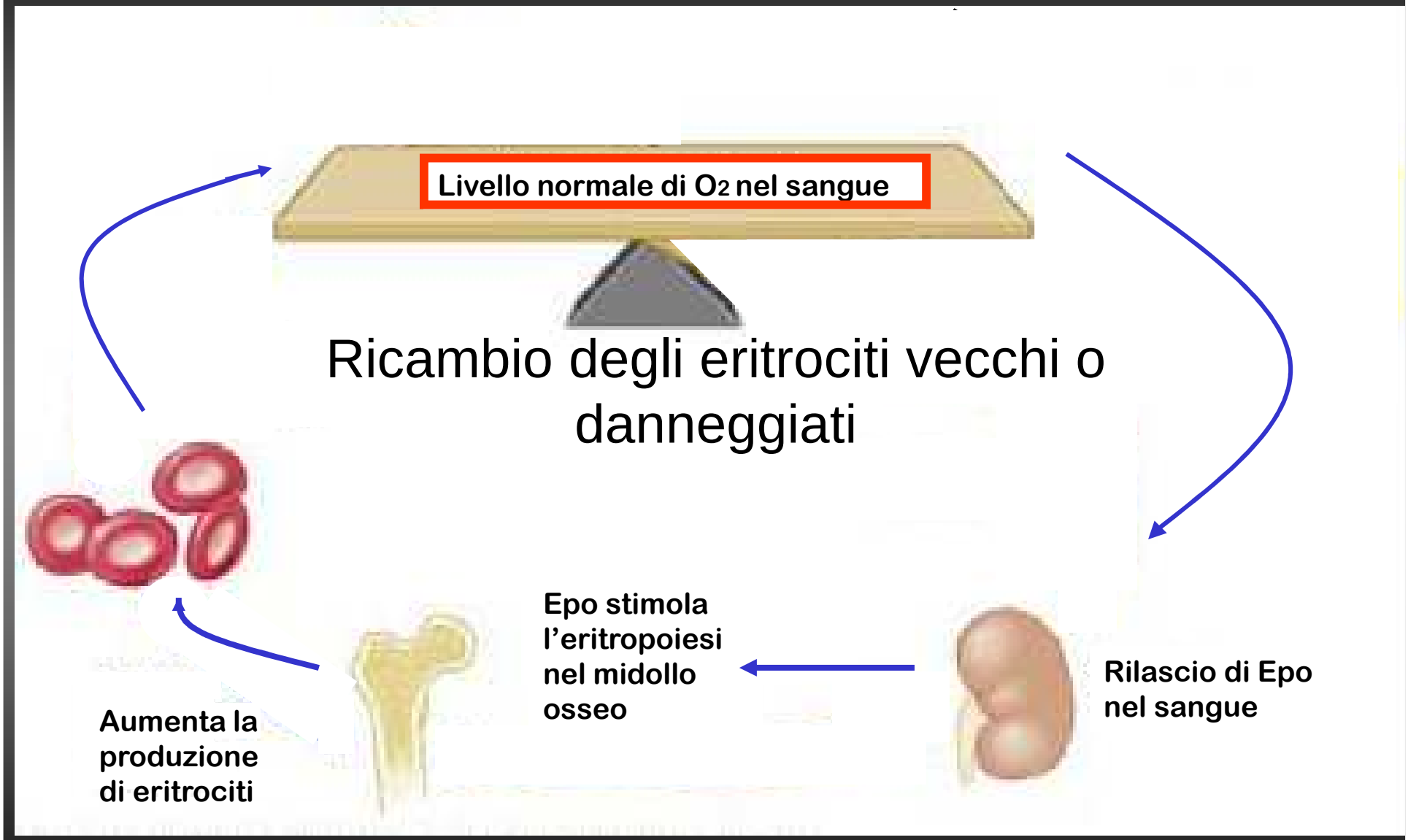
Promotore

- Omologia >73% con il promotore del gene Epo murino
- Regione –61 –45: contribuisce alla regolazione da parte dell'ipossia sequenza di legame per *Sp1*
- Sito di legame per GATA: inibizione dell'espressione di Epo
- Sito CACCC: sequenza stimolatrice dell'espressione di Epo

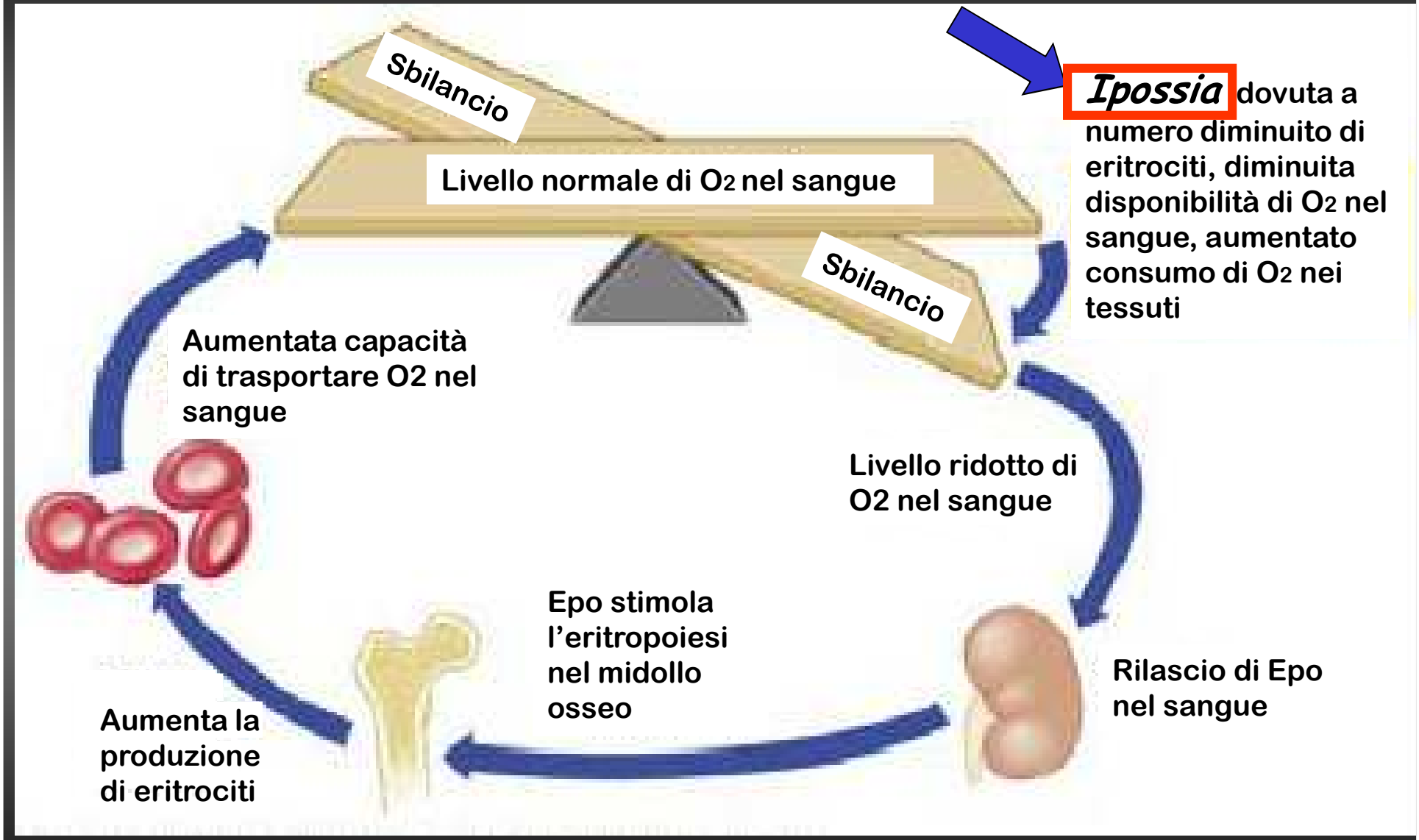
Sp1: fattore di trascrizione ubiquitario

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DA PARTE DELL'ERITROPOIETINA

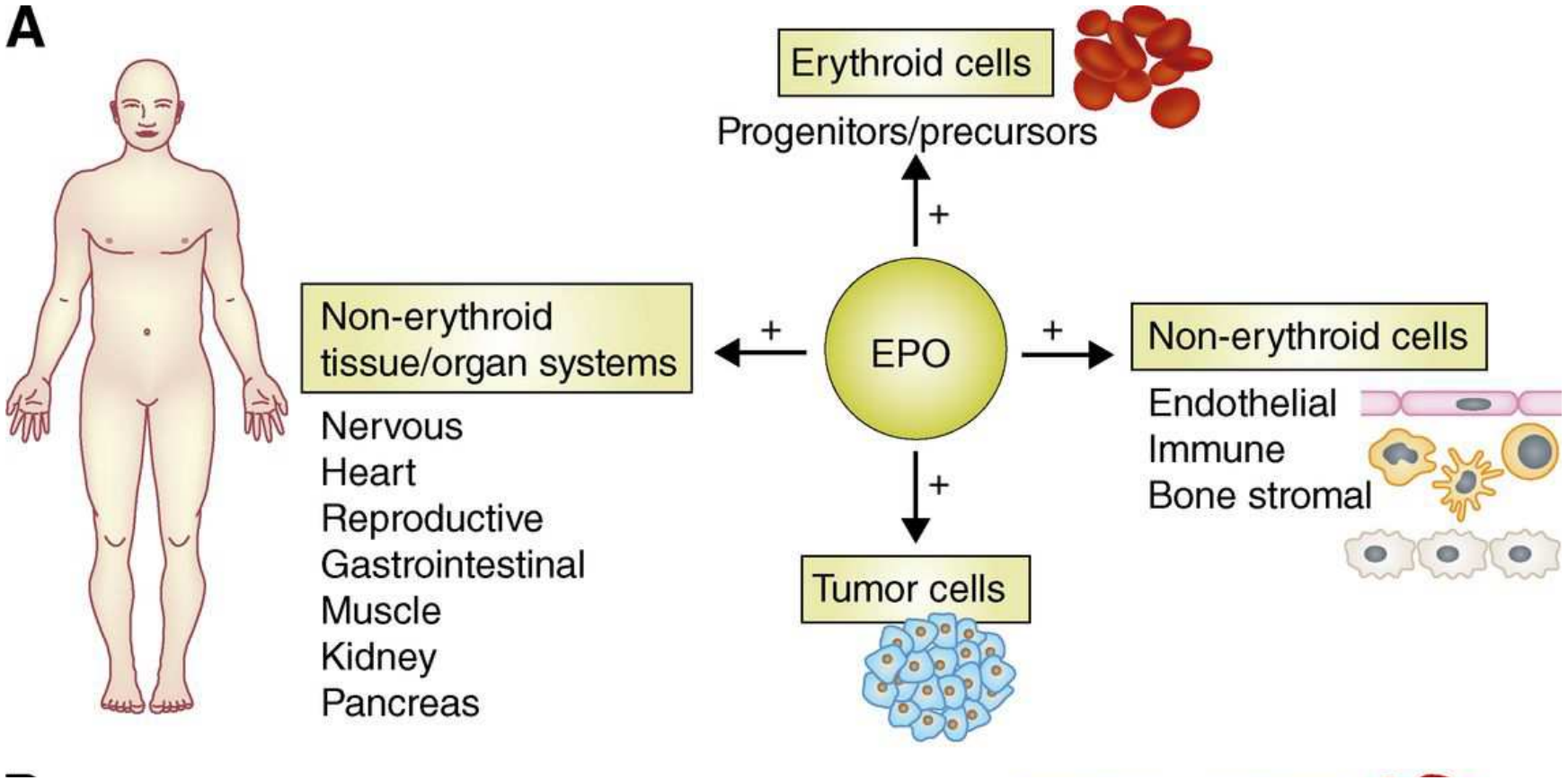
REGOLAZIONE DELL'Epo



REGOLAZIONE DELL'Epo



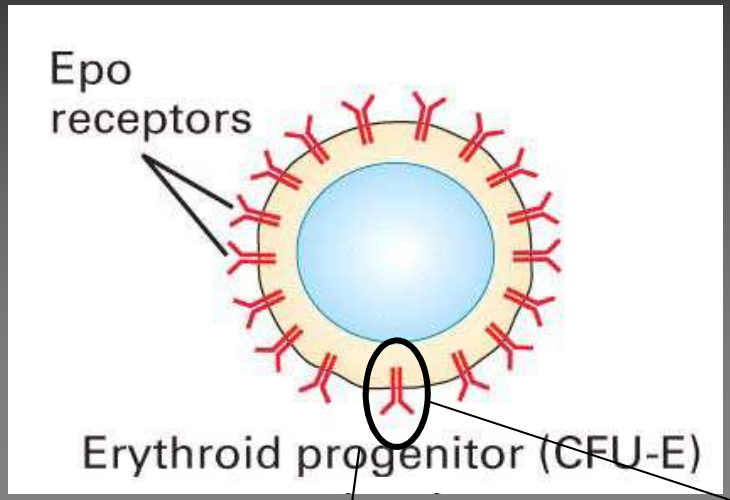
Multifaceted effects and targets of EPO. (A) EPO targets many cell types and tissues, including erythroid cells and their progenitors, tumor cells, and a variety of other nonerythroid cells and tissues.



Broxmeyer H E J Exp Med 2013;210:205-208

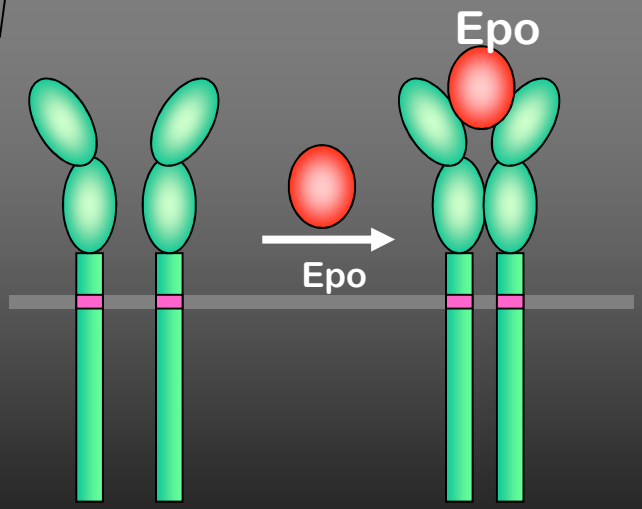
© 2013 Broxmeyer

Il recettore dell'Epo (EpoR)



Glicoproteina transmembrana

Monomero: 66 kDa (507 aa)



Famiglia dei recettori delle citochine:

Legame del ligando

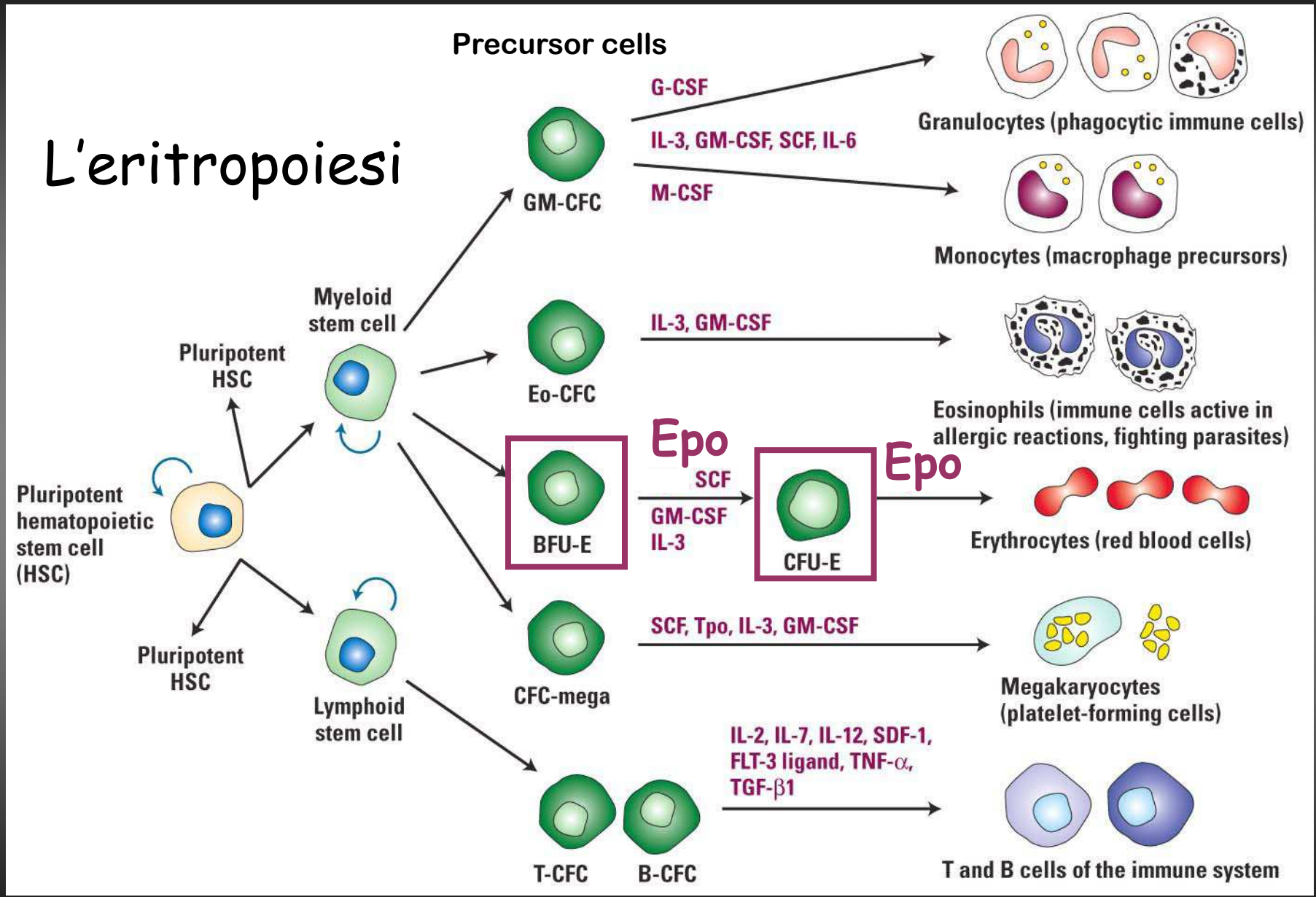
↓

Dimerizzazione

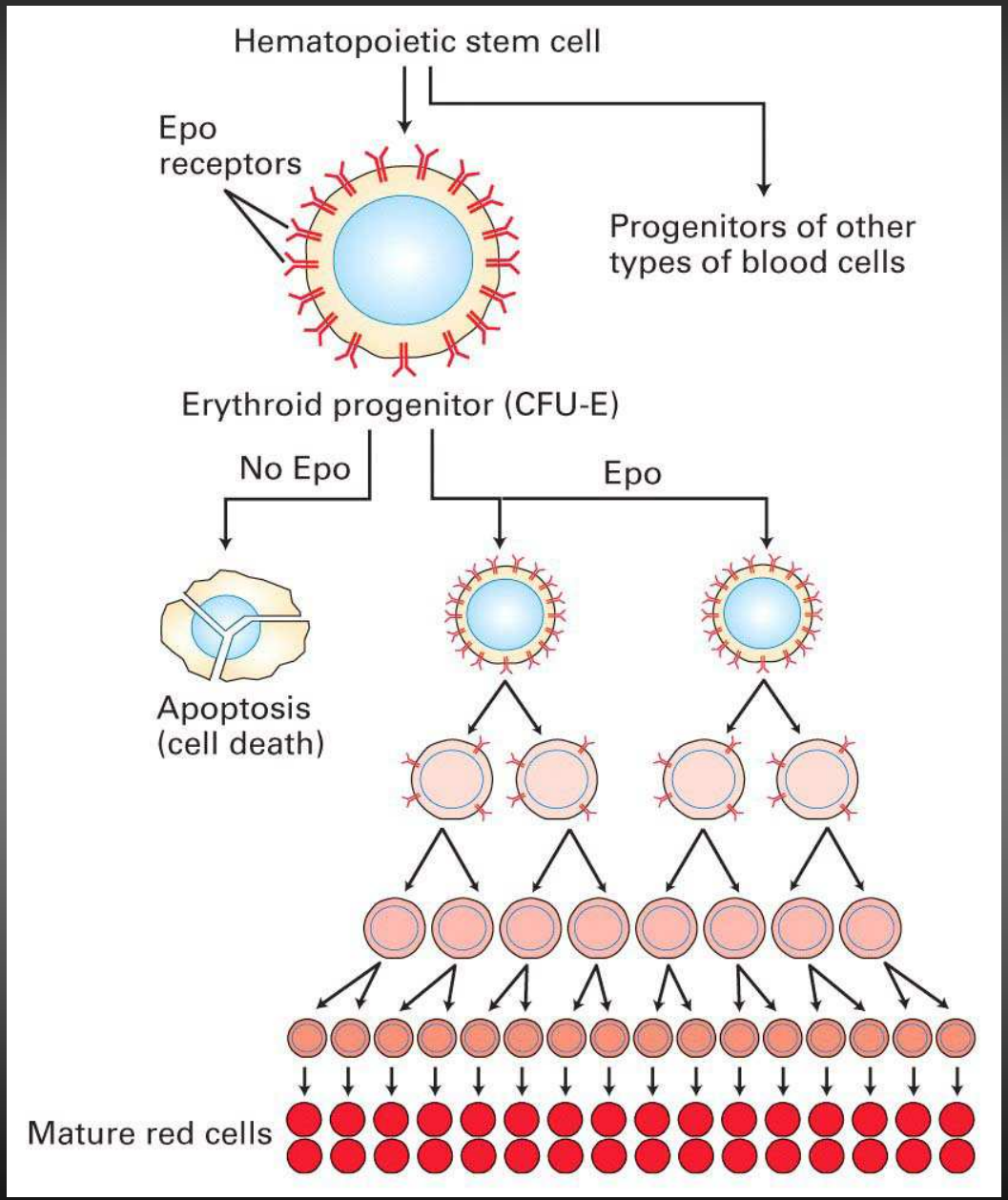
↓

Attivazione del recettore

L'eritropoiesi



Ruolo dell'Epo nell'eritropoiesi



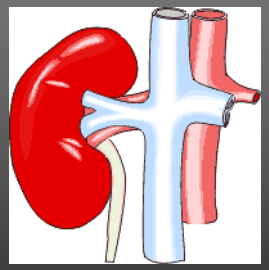
EpoR è espresso sulla superficie delle cellule eritroidi (massima espressione sulle CFU-E, diminuita sugli stadi più differenziati)

Epo agisce "salvando" dall' apoptosi le cellule progenitrici eritroidi, e stimolandone la maturazione

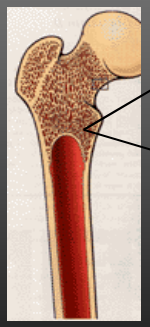
ERITROPOIETINA (Epo)

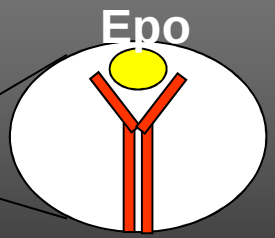
- Ormone glicoproteico di 34 kDa (165 aa)
- Struttura a 4 α-eliche (A,B,C,D)
- Funzione: stimola l'eritropoiesi

SINTESI *LEGAME CON IL RECETTORE*

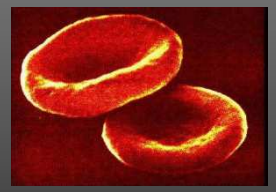


Reni



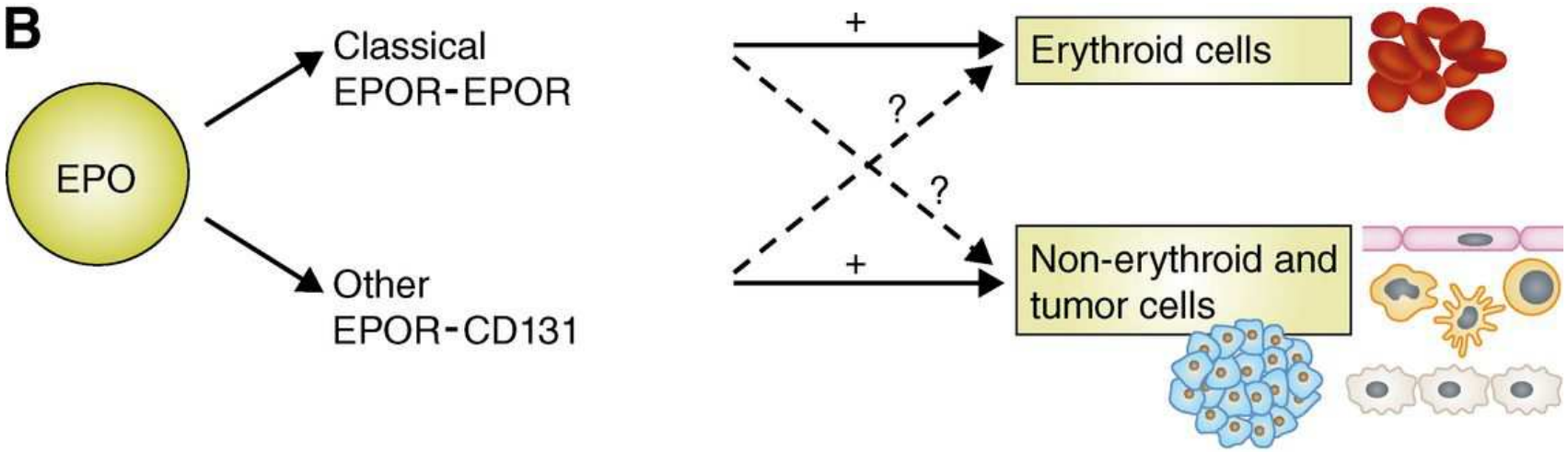


Midollo osseo



PRODUZIONE DI ERITROCITI

Multifaceted effects and targets of EPO. (A) EPO targets many cell types and tissues, including erythroid cells and their progenitors, tumor cells, and a variety of other nonerythroid cells and tissues.

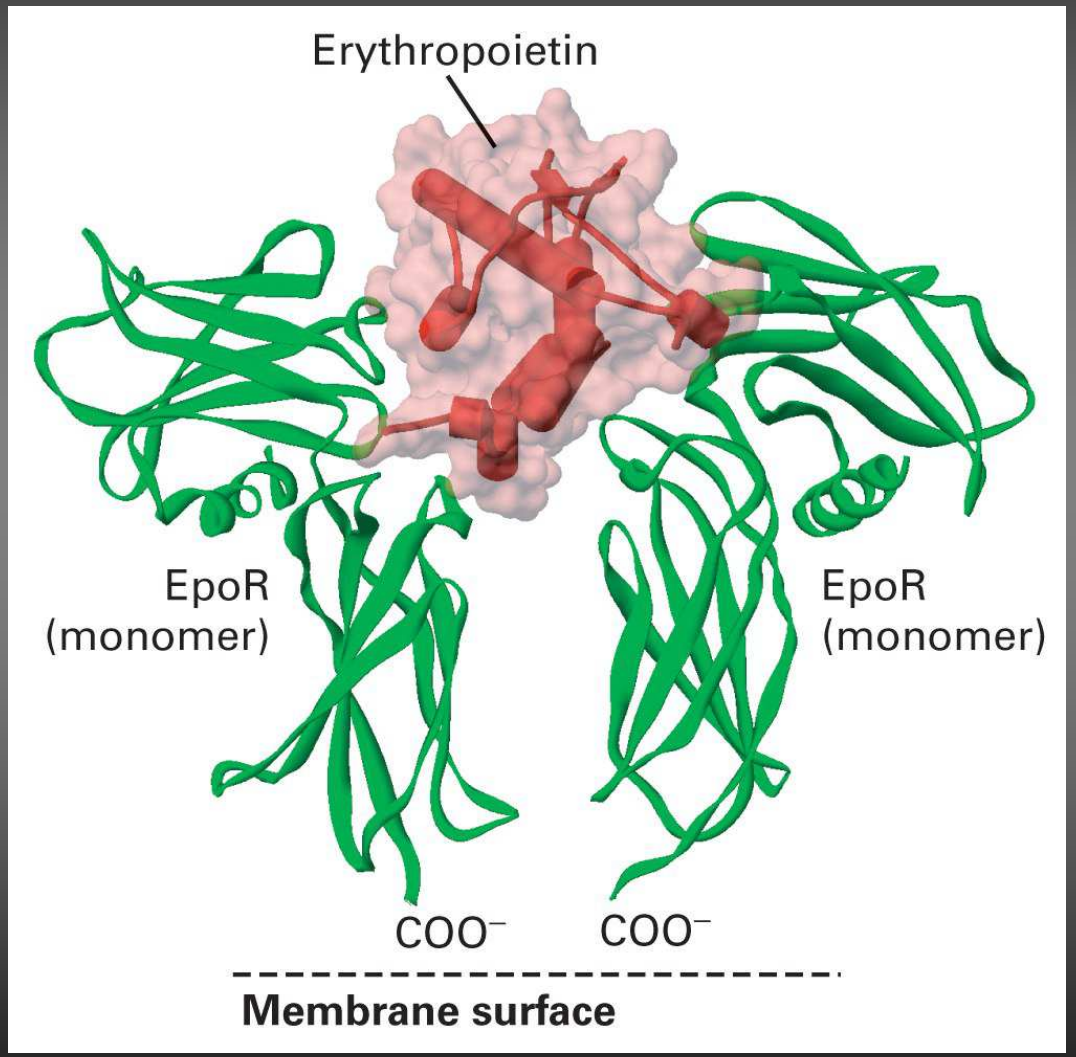


EPO signals in erythroid cells via EPOR-EPOR homodimers and in nonerythroid cells via EPOR-CD131 heterodimers

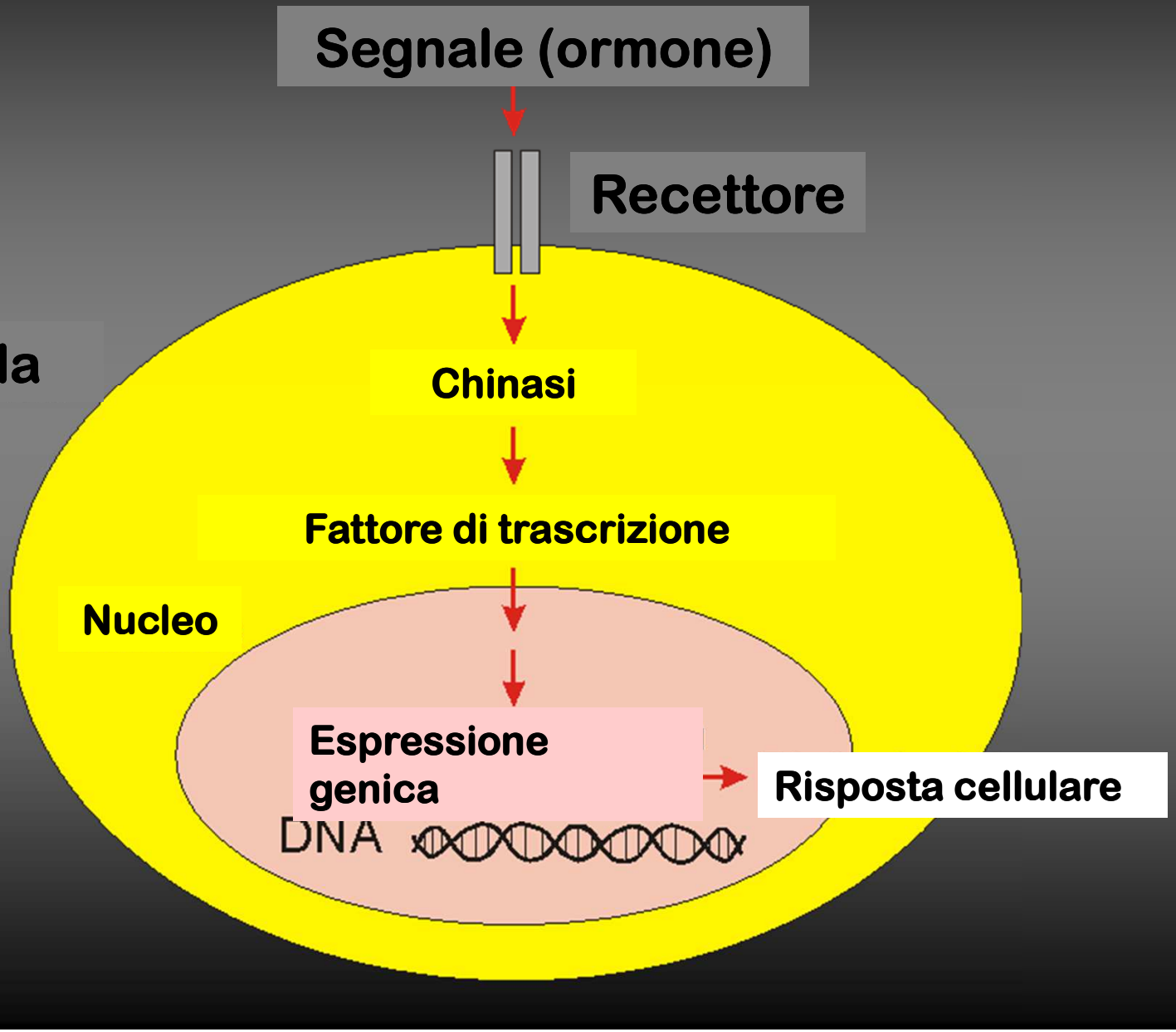
Broxmeyer H E J Exp Med 2013;210:205-208

© 2013 Broxmeyer

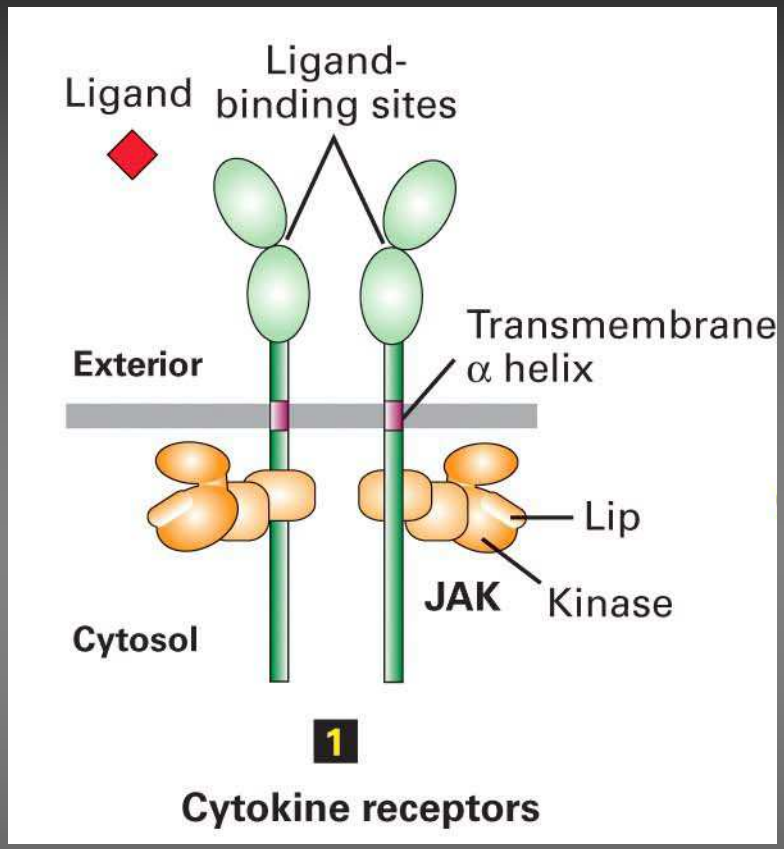
Erythropoietin-Epo Receptor complex



TRASDUZIONE DEL SEGNALE



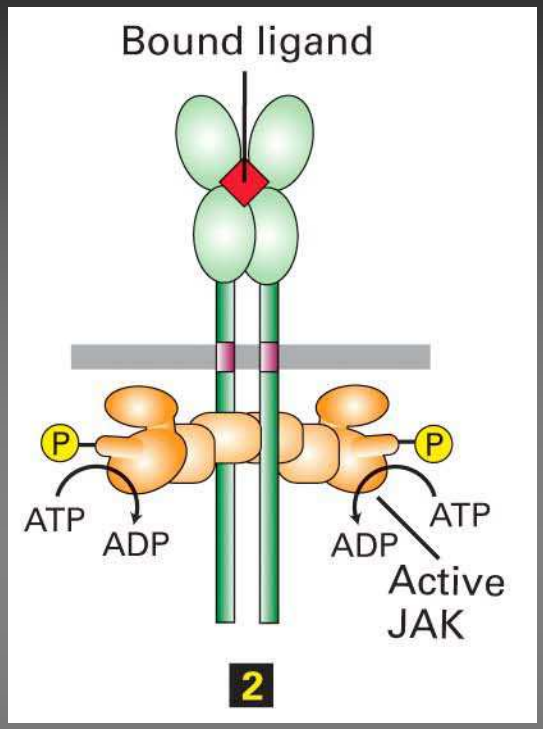
Trasduzione del segnale



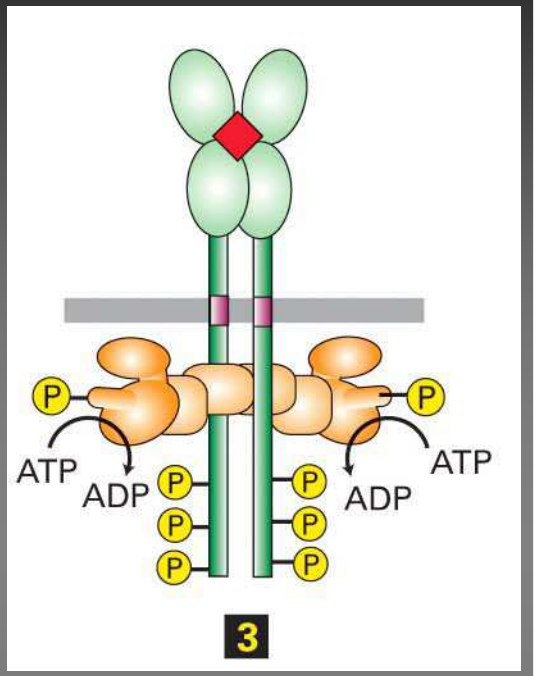
Dominio intracellulare privo di attività catalitica

⇩

Una JAK chinasi è associata al dominio citosolico di EpoR

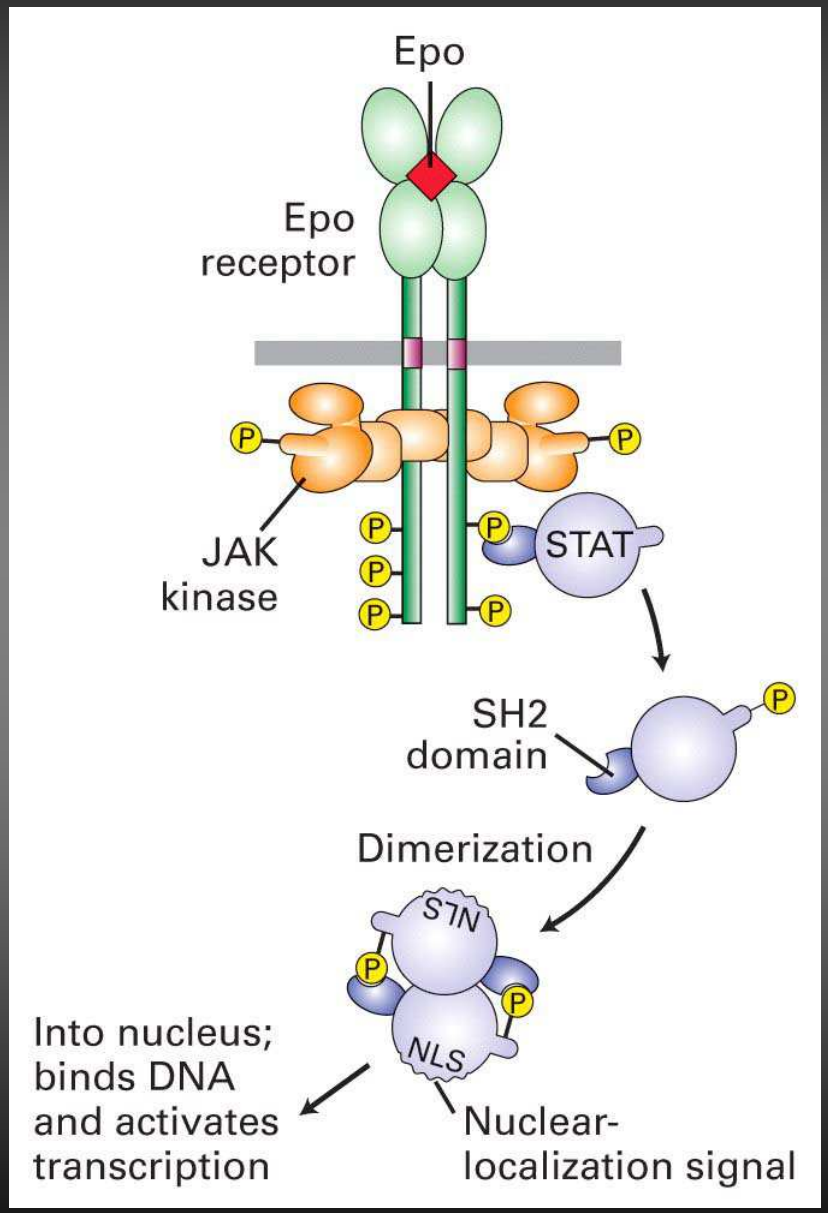


Dimerizzazione di EpoR
Fosforilazione di JAK e attivazione di JAK chinasi



JAK fosforila i residui di Tyr del dominio intracellulare di EpoR

Trasduzione del segnale



4) Legame di STATai residui di fosfo-Tyr di EpoR, mediante il dominio SH2 di STAT

5) Fosforilazione di STAT (fattore di trascrizione)

6) Dissociazione di STAT da EpoR e dimerizzazione di STAT

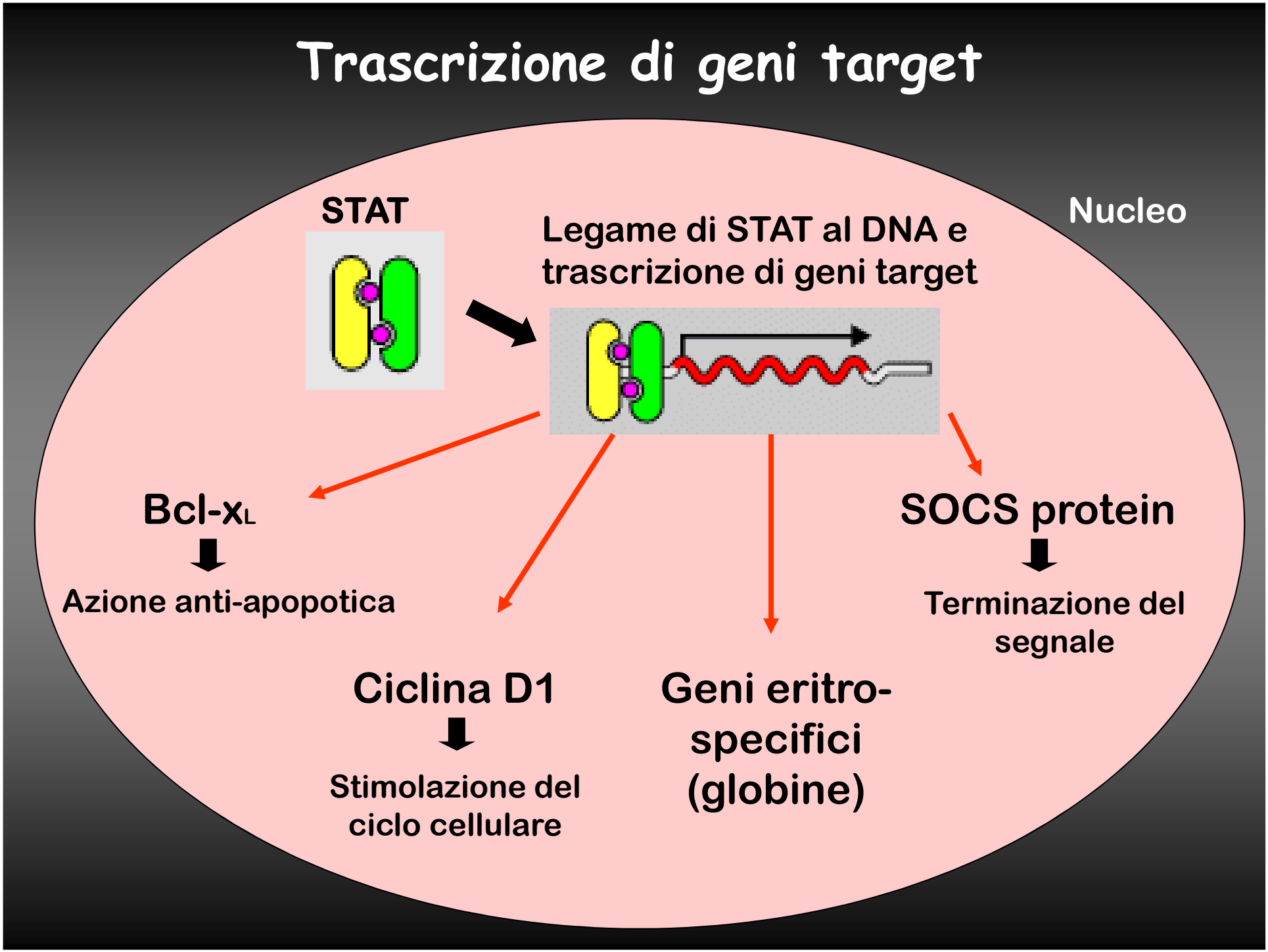
⇩

Esposizione di NLS (nuclear-localization signal)

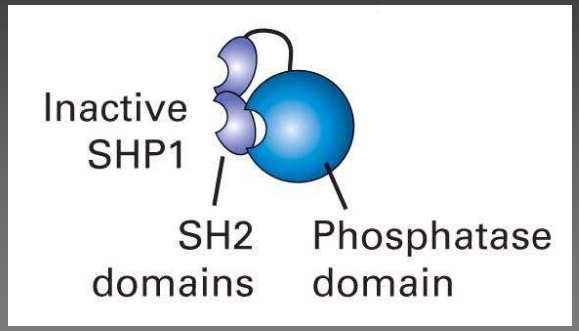
⇩

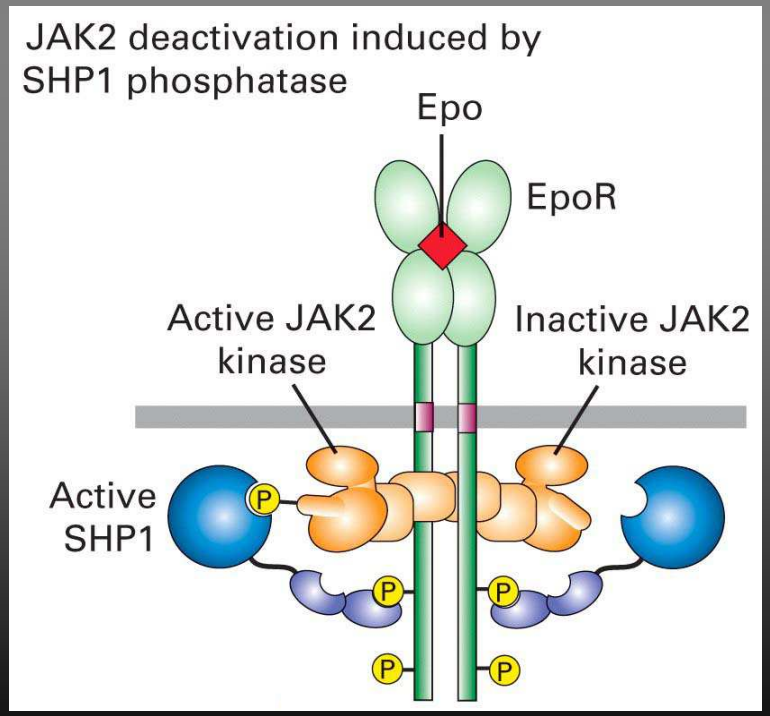
Spostamento di STAT al nucleo e legame a sequenze enhancer specifiche

Trascrizione di geni target



Terminazione del segnale
A breve termine: *SHP1 fosfatasi*





Struttura:

-2 domini SH2

-1 dominio catalitico ad attività fosfatasica

Forma inattiva:

1 dominio SH2 è legato al sito catalitico e lo nasconde

Forma attiva:

il dominio SH2 si lega ad una fosfo-Tyr del recettore

⇩

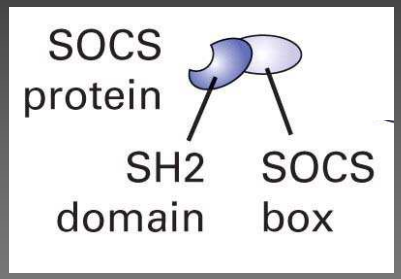
esposizione del sito catalitico, attività fosfatasica nei confronti di JAK

⇩

Inattivazione di JAK e terminazione della trasduzione del segnale

Terminazione del segnale

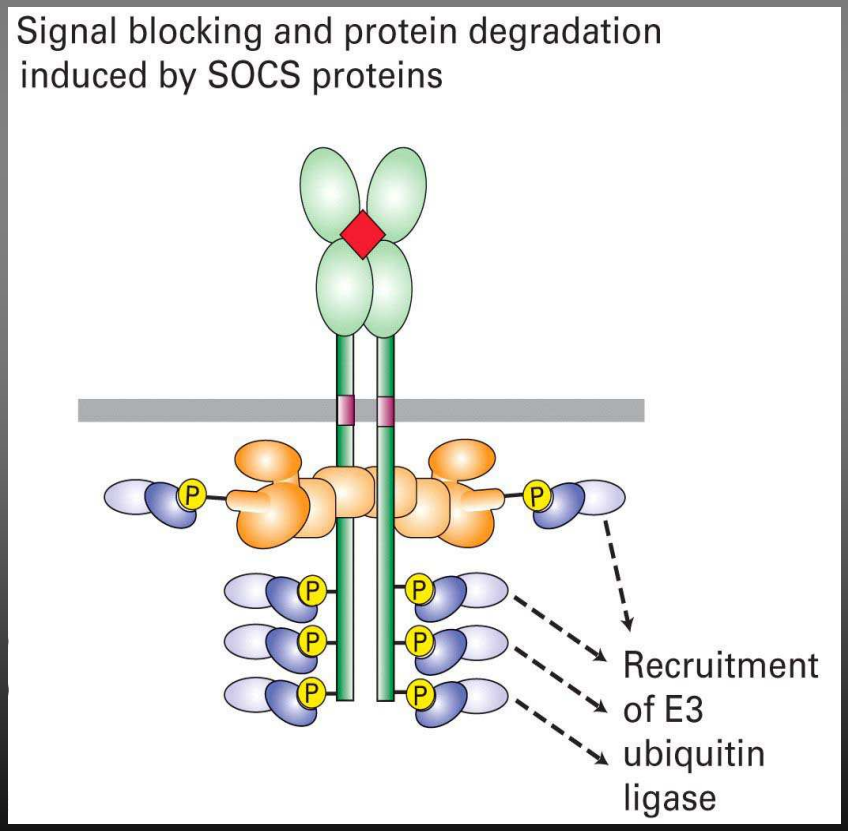
A lungo termine: *SOCS proteins*



Struttura:

-1 dominio SH2

-1 dominio SOCS (SOCS box) □ richiama E3 ubiquitina ligasi



Meccanismo d'azione:

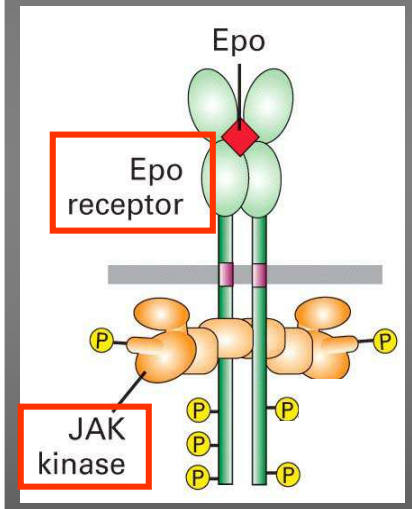
a) Il dominio SH2 si lega alle fosfo-Tyr del recettore: impedisce il legame di STAT

b) Il dominio SOCS richiama E3

⇩

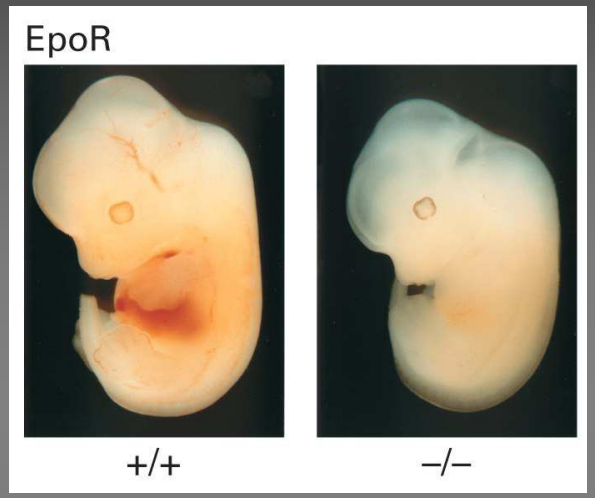
Ubiquinizzazione e degradazione proteosomica di JAK

Trasduzione del segnale Epo-EpoR



Topi knock-out per EpoR (Wu et al. Cell 1993)

Mancata formazione degli eritrociti → *Morte dell'embrione al 13° giorno per anemia*



Topi knock-out per JAK (Neubauer et al. Cell 1998)