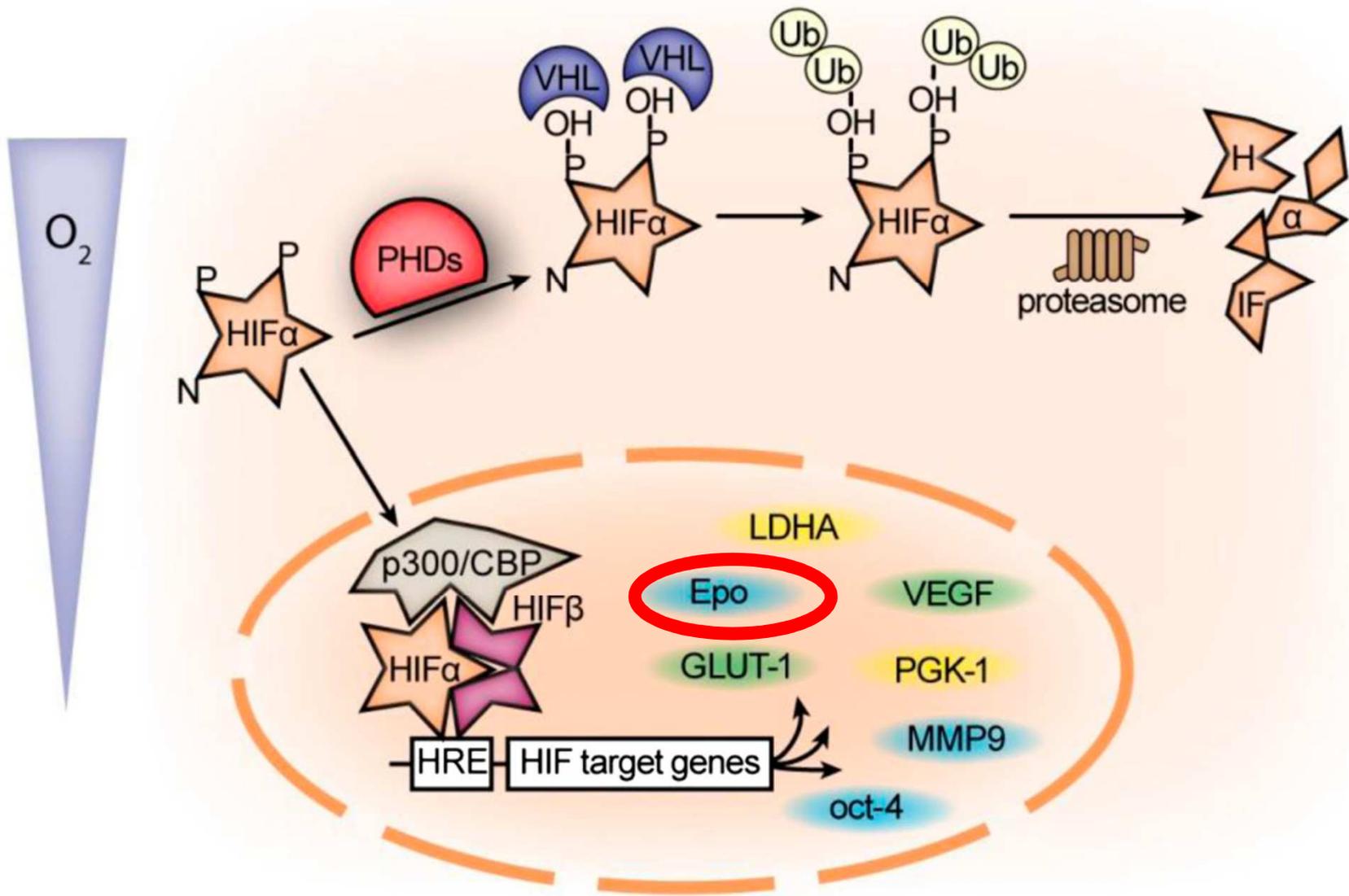
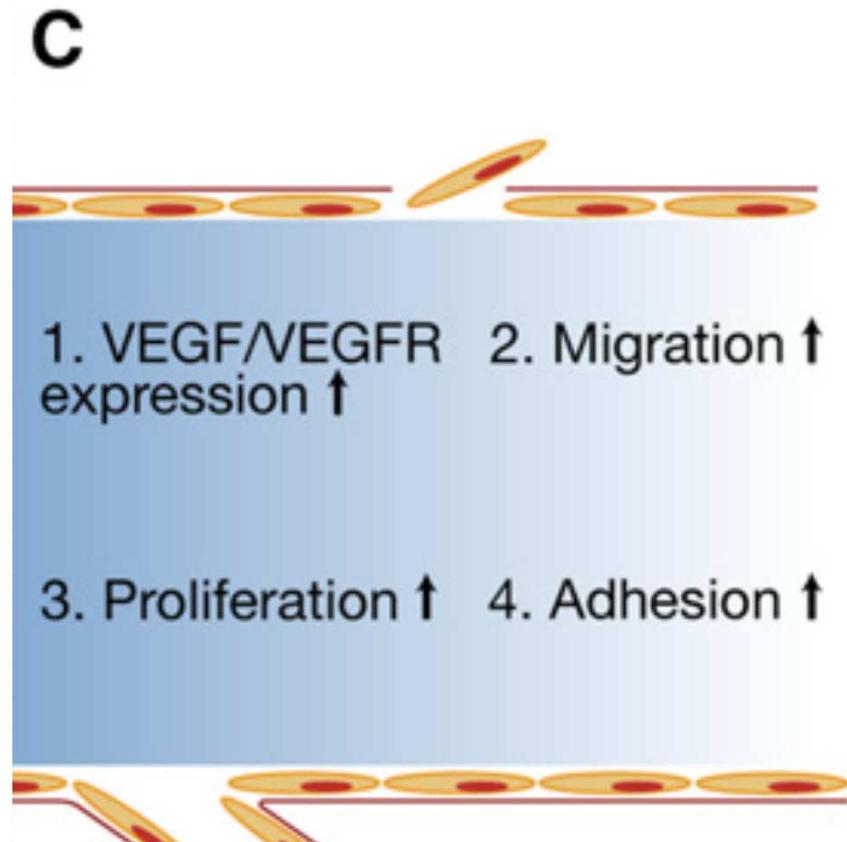
A microscopic view of numerous red blood cells, which are biconcave discs, filling the frame. The cells are densely packed and appear in various shades of red and orange, with some showing a distinct central pallor. The background is dark, making the individual cells stand out.

*Molecular mechanism  
of oxygen sensing(2)*



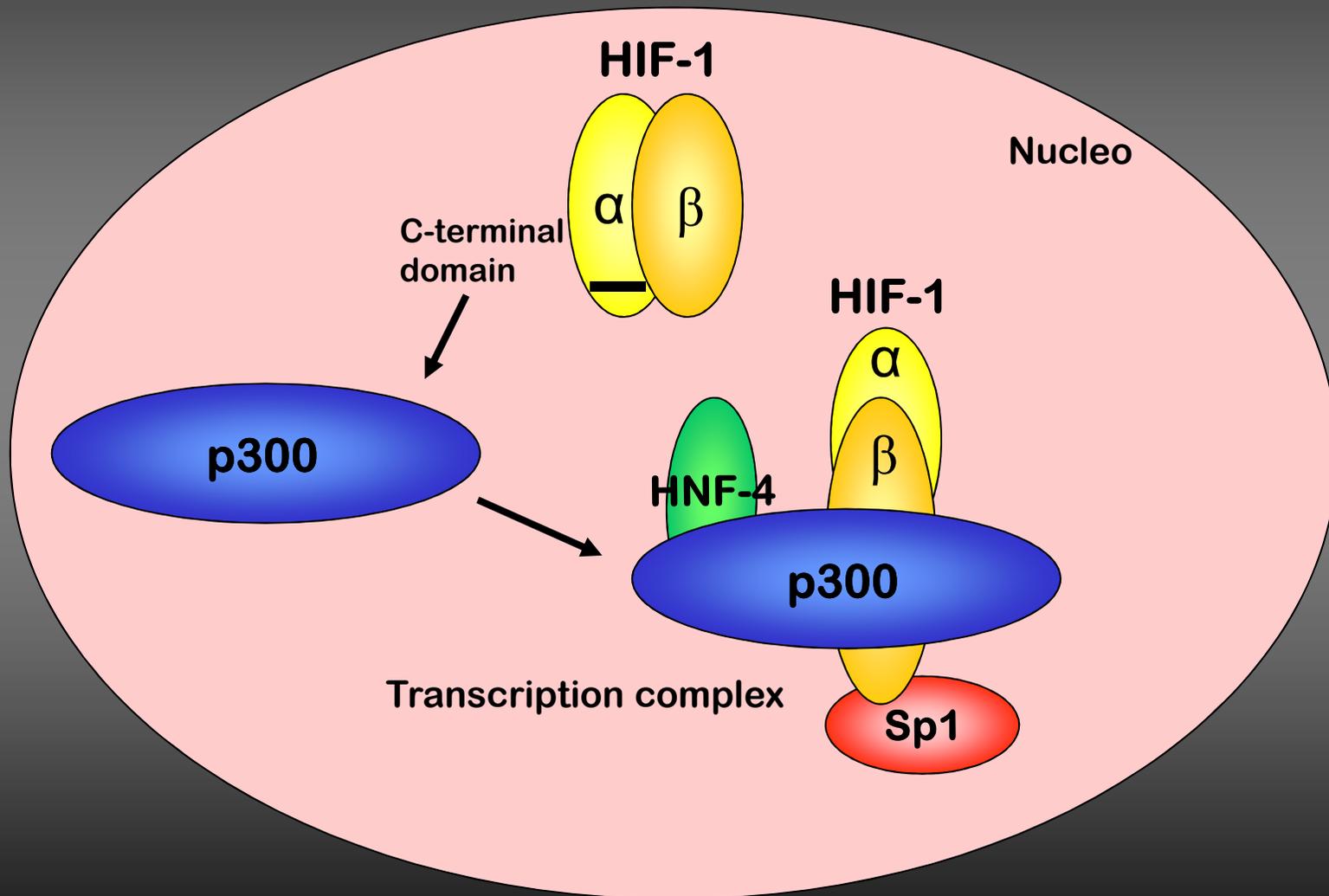
## Vascular Responses to HIF: Endothelial Cells (Ecs)



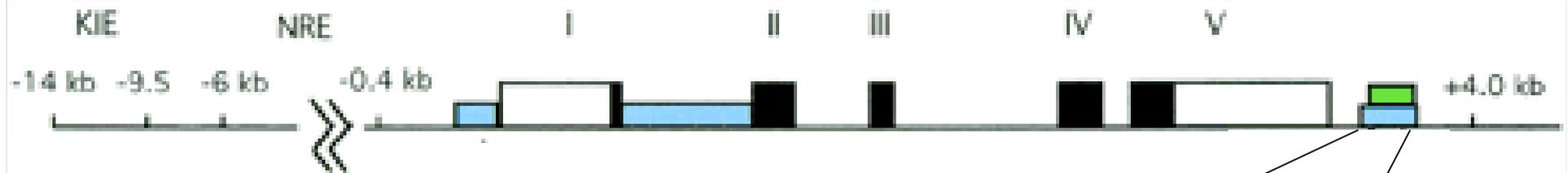
HIF1a stabilization in ECs increases (1) VEGF expression, (2) migration, and (3) proliferation, whereas HIF2a stabilization promotes (4) EC adhesion to the extracellular matrix



# Regolazione del gene Epo da parte dell'ipossia

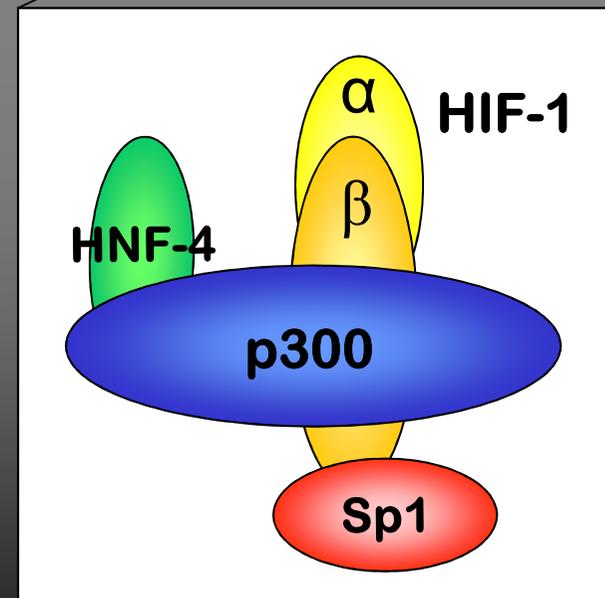


# Regolazione del gene Epo da parte dell'ipossia

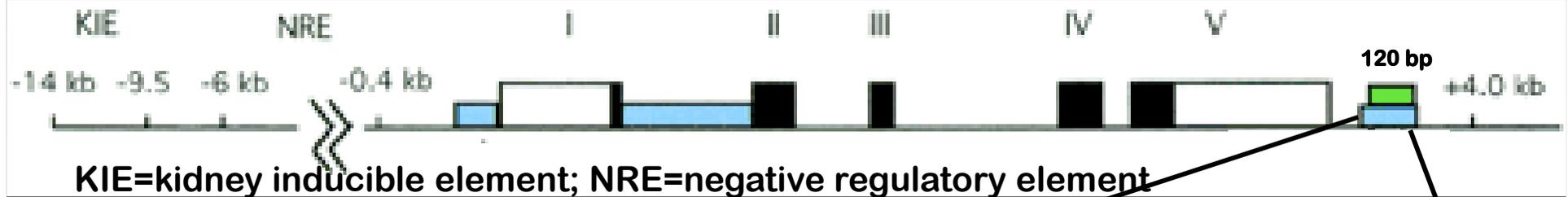


Promotore

Transcription complex



# Regolazione del gene Epo da parte dell'ipossia



50 pb nella  
Regione 3'

GGCCCTACGGTGTCTGTCTCACACAGCCCTGTCTGACCTCTCGACCTACCG

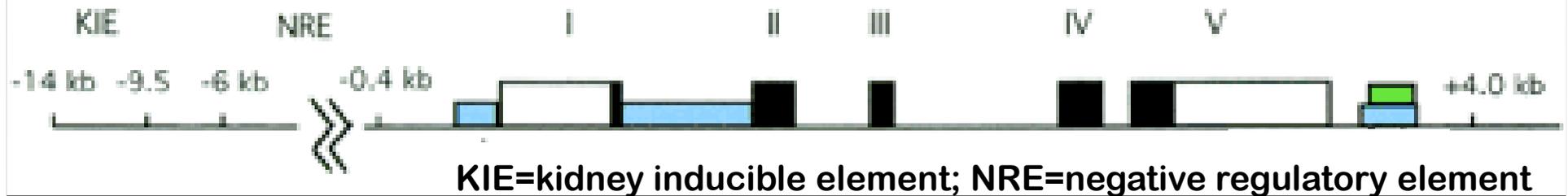
Sequenza di  
legame per  
*HIF-1*

Sequenza di  
legame per  
*HNF-4*

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

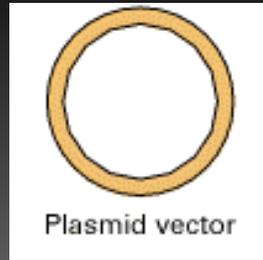
**HNF-4 (Hepatocyte nuclear factor 4)**  
fattore di trascrizione  
espresso nel cortex renale e nel fegato  
come Epo →  
contribuisce alla regolazione tessuto-specifica

# Regolazione tessuto-specifica del gene Epo

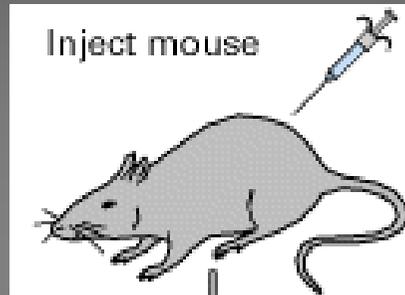
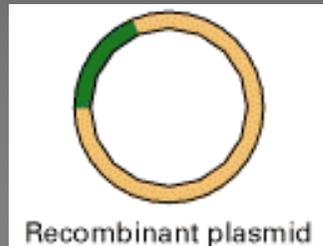


## Regione 5'

- 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



+



Regione 5'

Regione 3'

1

400 bp

Epo gene

700 bp

2

6 kb

Epo gene

700 bp

3

9.5 kb

Epo gene

700 bp

4

14 kb

Epo gene

700 bp

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



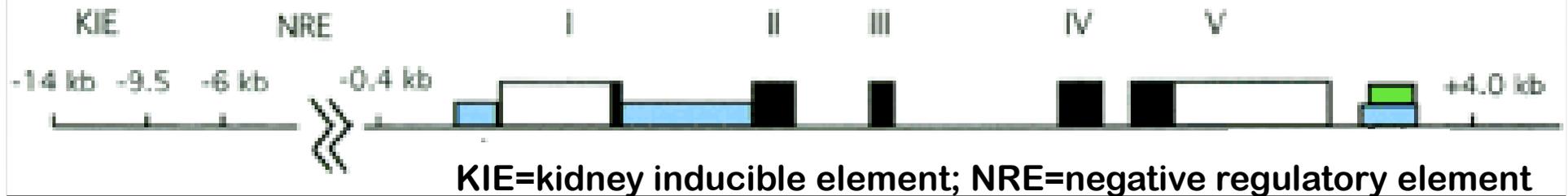
Entro le 9.5 kb: sequenze per l'espressione nel fegato

4. Epo espresso nel rene



9.5-14 kb: sequenze per l'espressione nel rene

# Regolazione tessuto-specifica del gene Epo



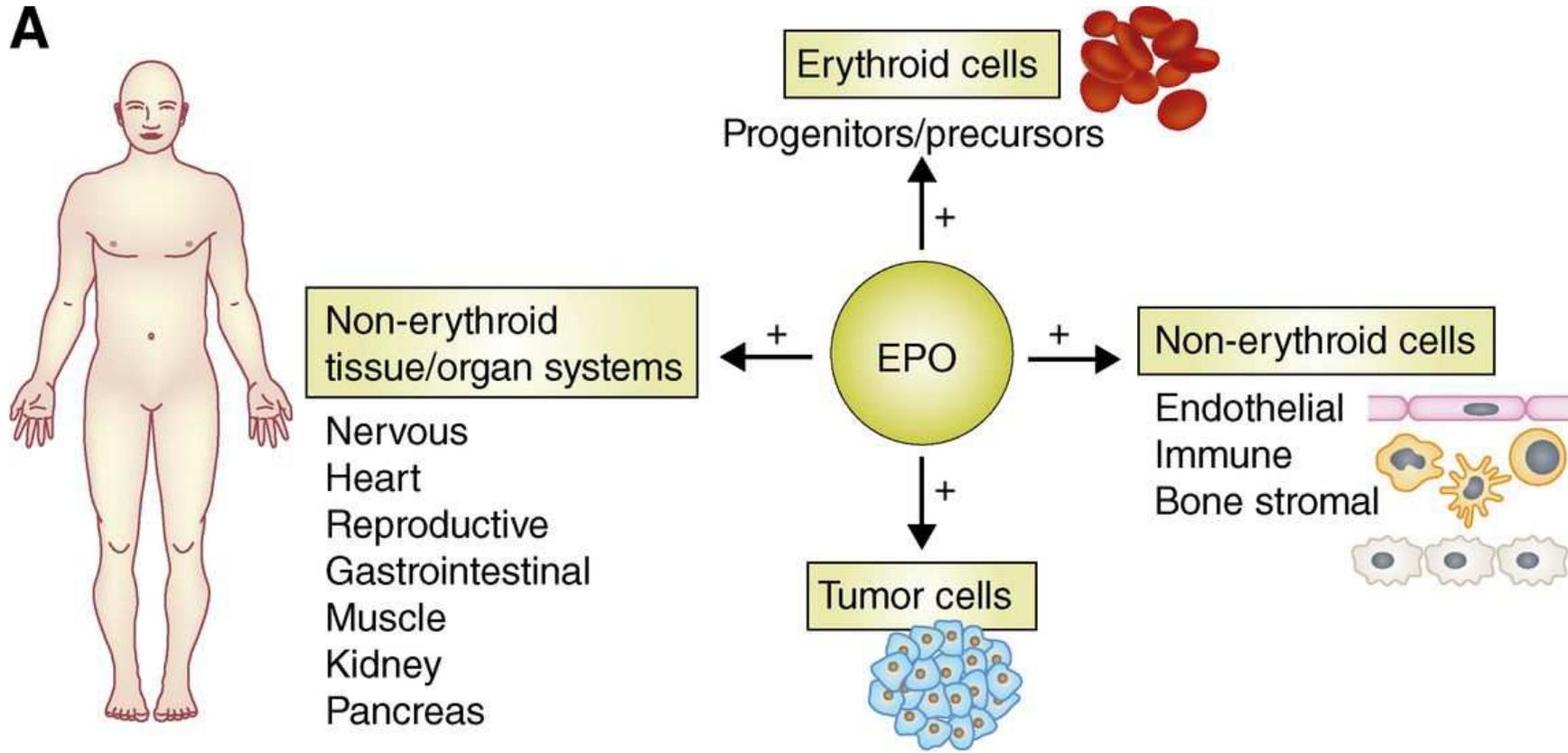
## Promotore

**Sp1:** fattore di trascrizione ubiquitario

- 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

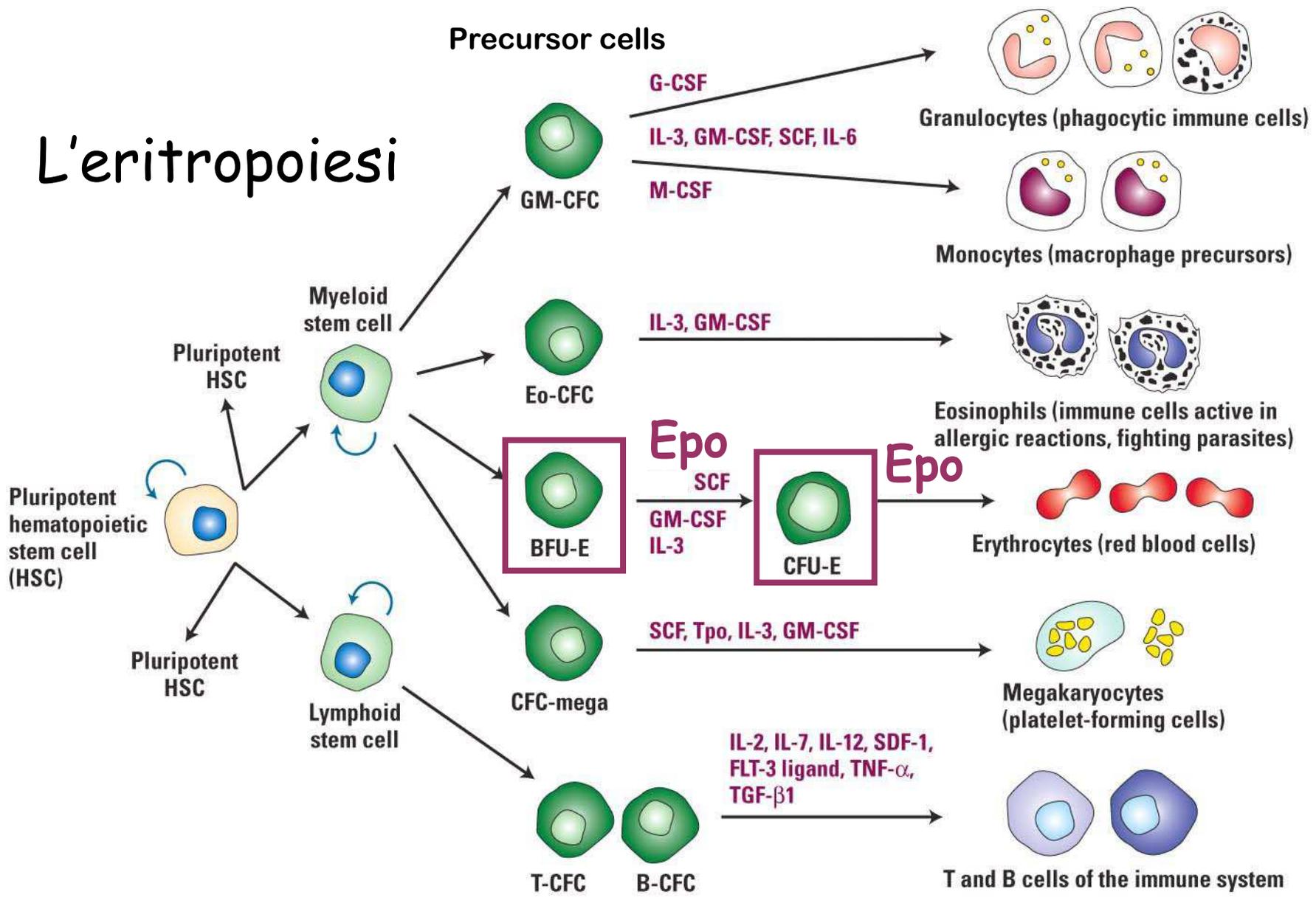
**REGOLAZIONE  
DELL'ESPRESSIONE  
DA PARTE  
DELL'ERITROPOIETINA**

**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.**

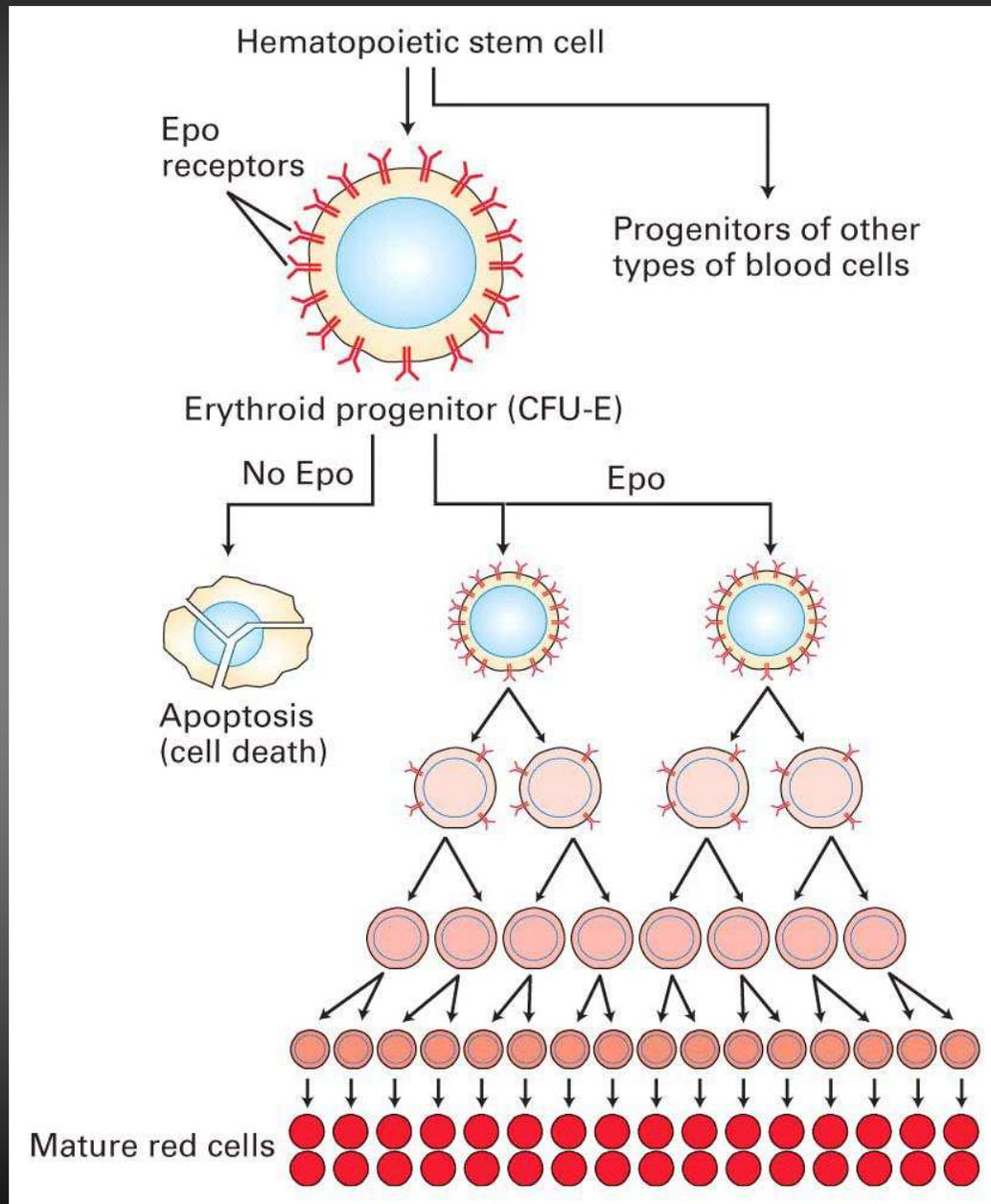


Broxmeyer H E J Exp Med 2013;210:205-208

# 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)

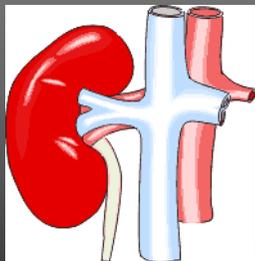
Epo agisce “salvando” dall’apoptosi le cellule progenitrici eritroidi, e stimolandone la maturazione

# ERITROPOIETINA (Epo)

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

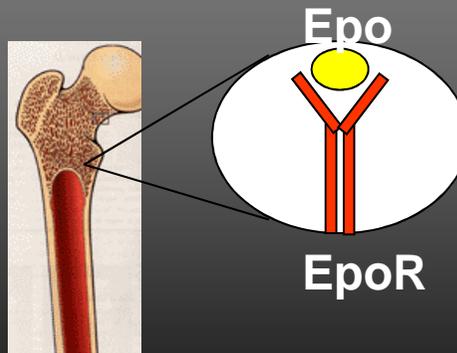


*SINTESI*



Reni

*LEGAME CON IL RECETTORE*

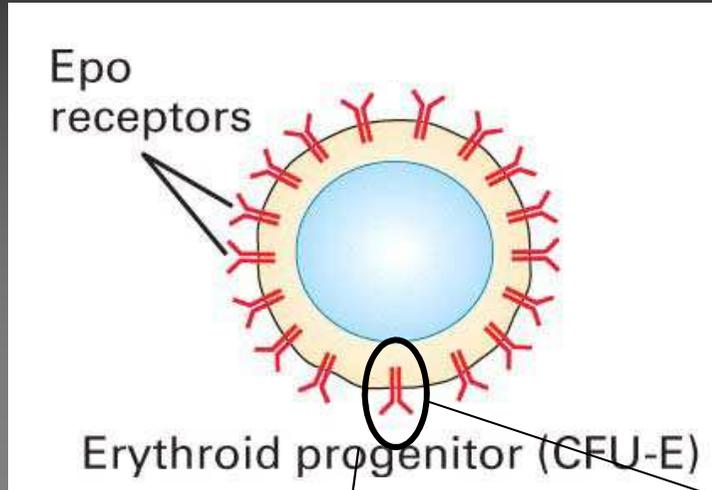


Midollo osseo



*PRODUZIONE DI  
ERITROCITI*

# Il recettore dell'Epo (EpoR)



Glicoproteina  
transmembrana

Monomero: 66  
kDa (507 aa)

Famiglia dei recettori  
delle citochine:

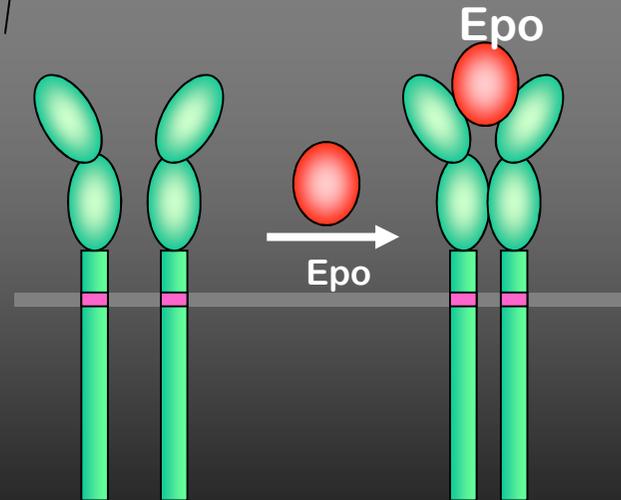
Legame del ligando



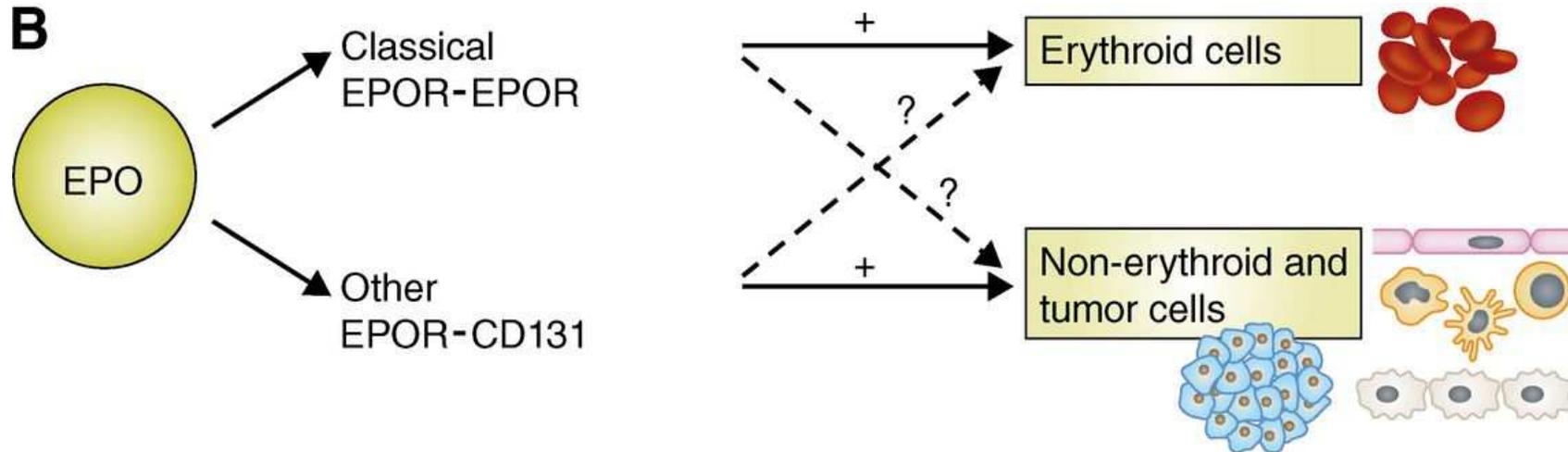
Dimerizzazione



Attivazione del  
recettore



**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.**

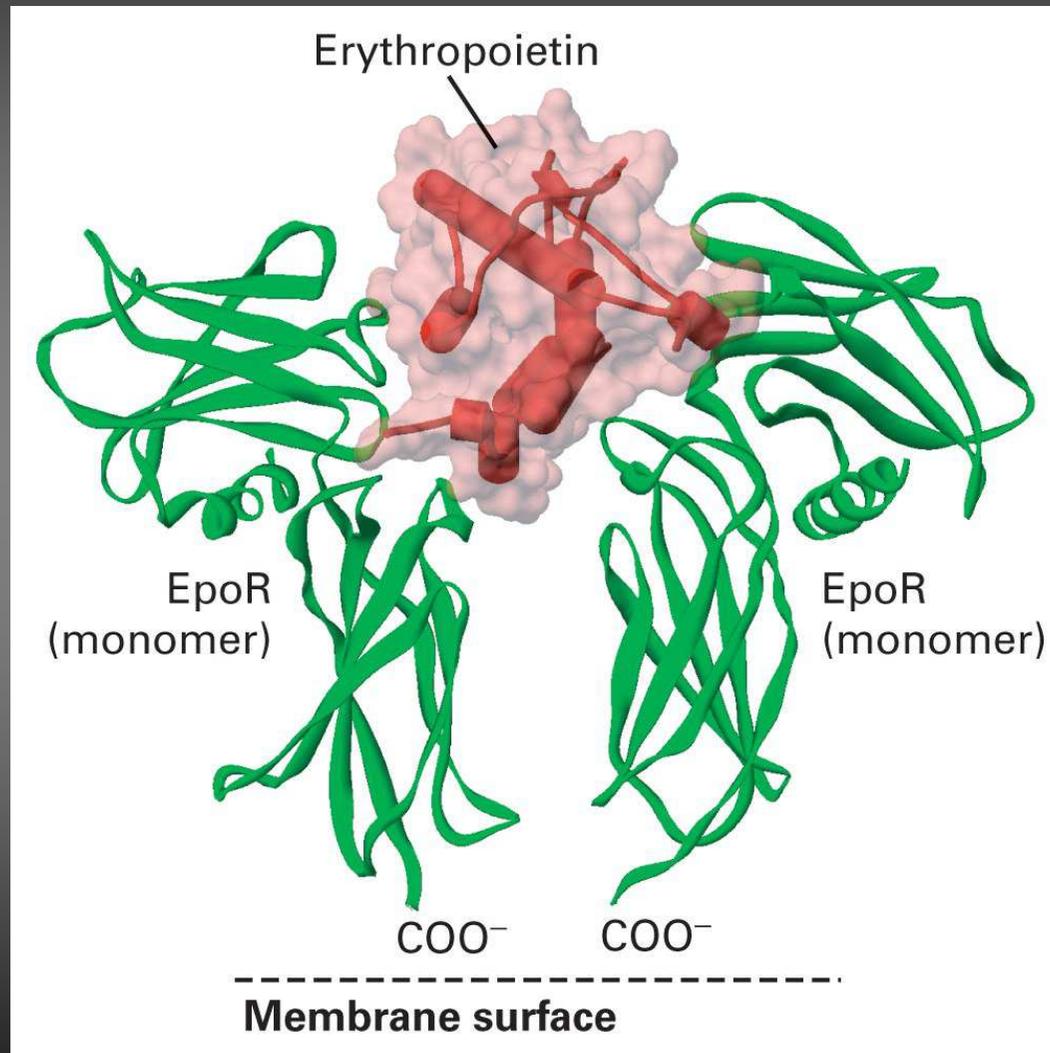


EPO signals in erythroid cells via EPOR-EPOR homodimers and in nonerythroid cells via EPOR-CD131 heterodimers

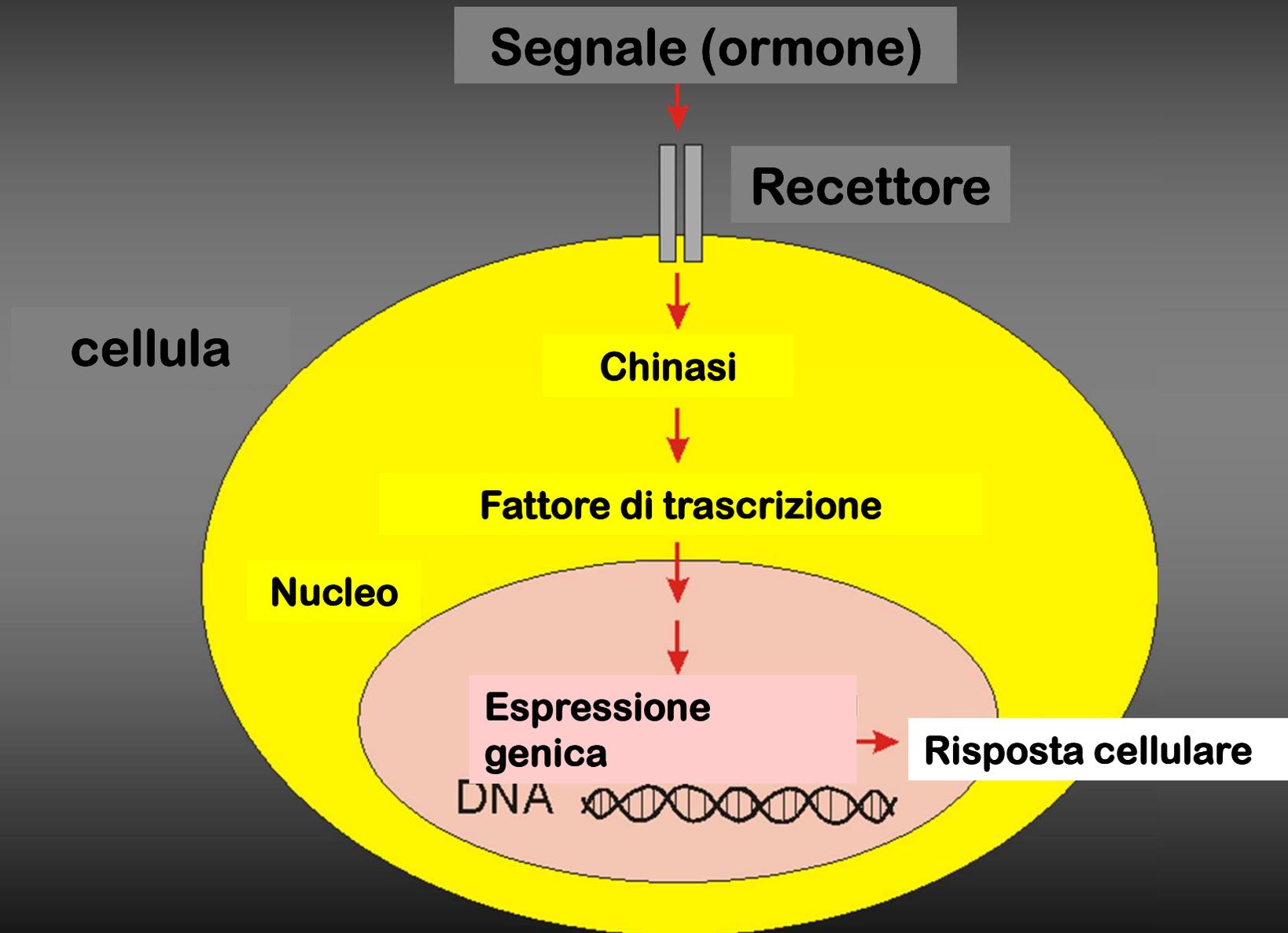
Broxmeyer H E J Exp Med 2013;210:205-208



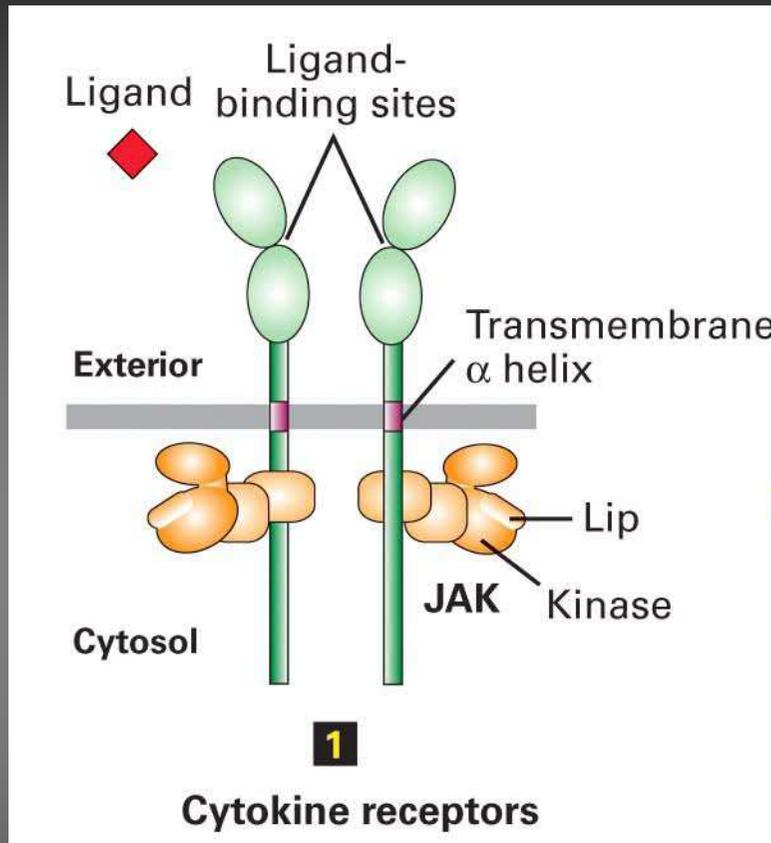
# Erythropoietin-Epo Receptor complex



# TRASDUZIONE DEL SEGNALE



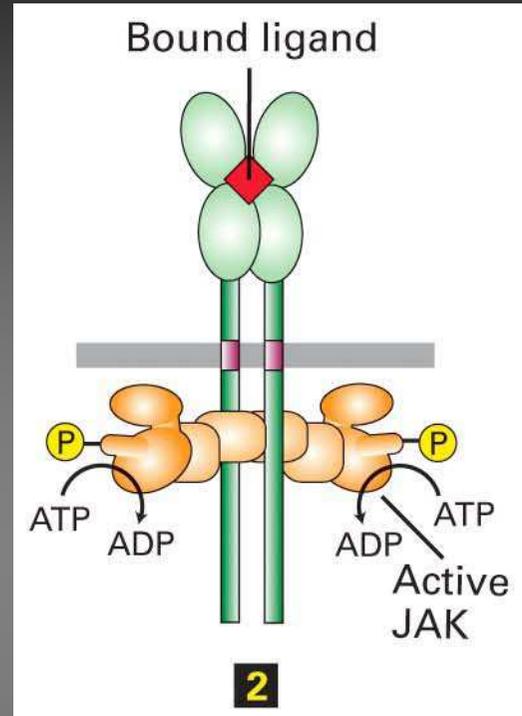
# Trasduzione del segnale



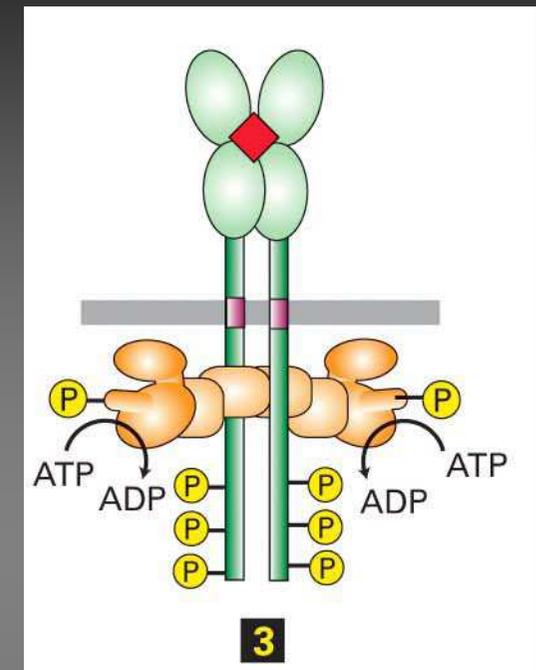
Dominio intracellulare privo di attività catalitica



Una JAK chinasi è associata al dominio citosolico di EpoR

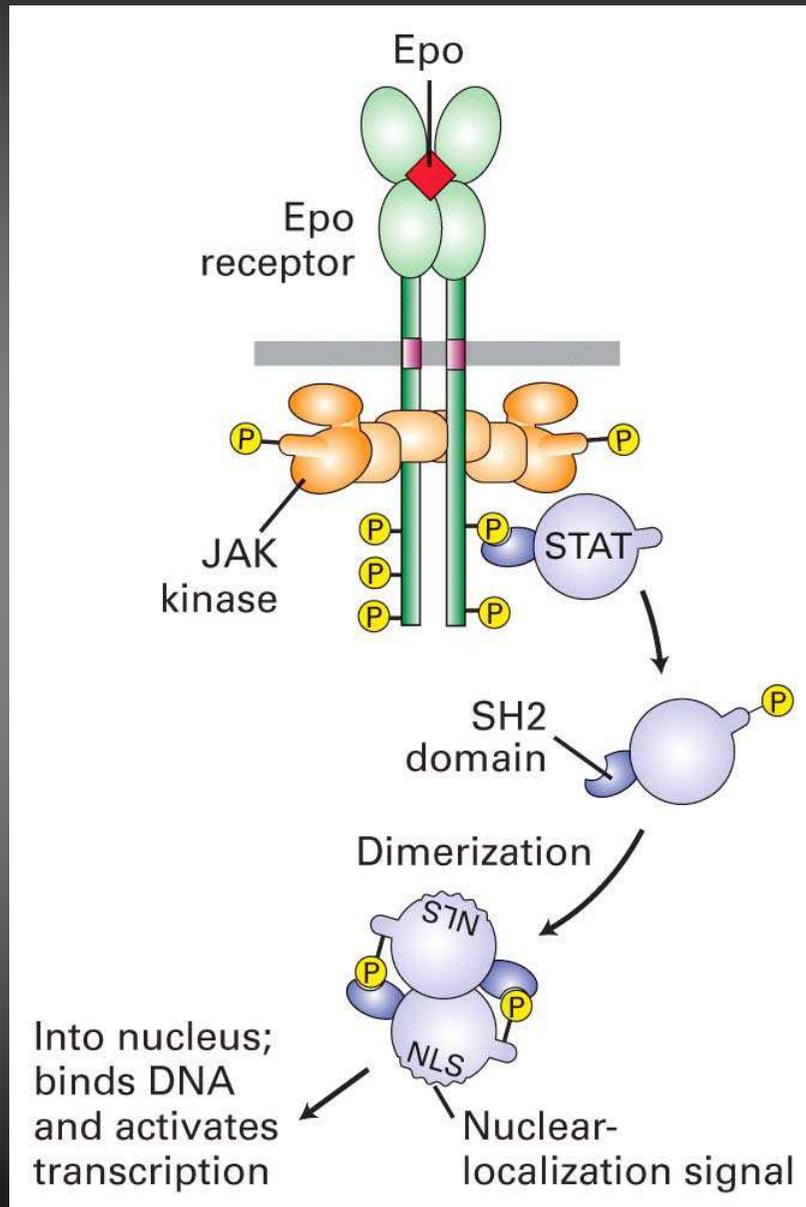


Dimerizzazione di EpoR  
Fosforilazione di JAK e attivazione di JAK chinasi



JAK fosforila i residui di Tyr del dominio intracellulare di EpoR

# Trasduzione del segnale



4) Legame di STAT ai 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)

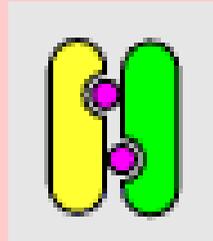


Spostamento di STAT al nucleo e legame a sequenze enhancer specifiche

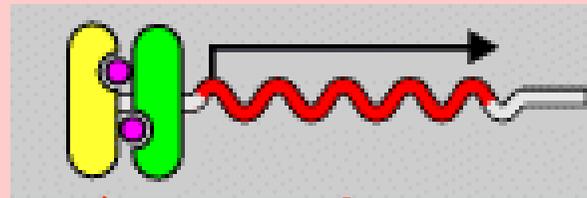
# Trascrizione di geni target

Nucleo

STAT



Legame di STAT al DNA e trascrizione di geni target



**Bcl-x<sub>L</sub>**



Azione anti-apopotica

**Ciclina D1**



Stimolazione del ciclo cellulare

**Geni eritrospecifici (globine)**

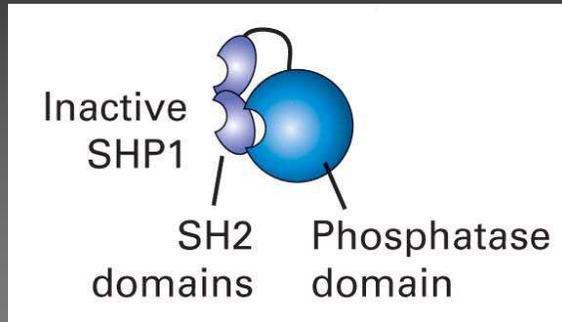
**SOCS protein**



Terminazione del segnale

# Terminazione del segnale

## A breve termine: *SHP1* fosfatasi



Struttura:

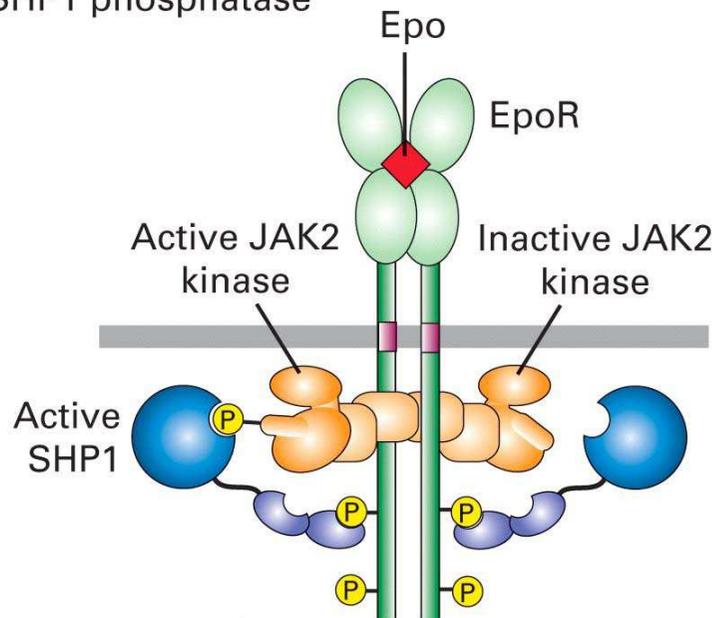
-2 domini SH2

-1 dominio catalitico ad attività fosfatasica

Forma inattiva:

1 dominio SH2 è legato al sito catalitico e lo nasconde

JAK2 deactivation induced by SHP1 phosphatase



Forma attiva:

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



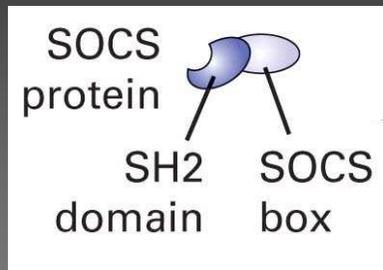
esposizione del sito catalitico, attività fosfatasica nei confronti di JAK



Inattivazione di JAK e terminazione della trasduzione del segnale

# Terminazione del segnale

## A lungo termine: *SOCS* proteins

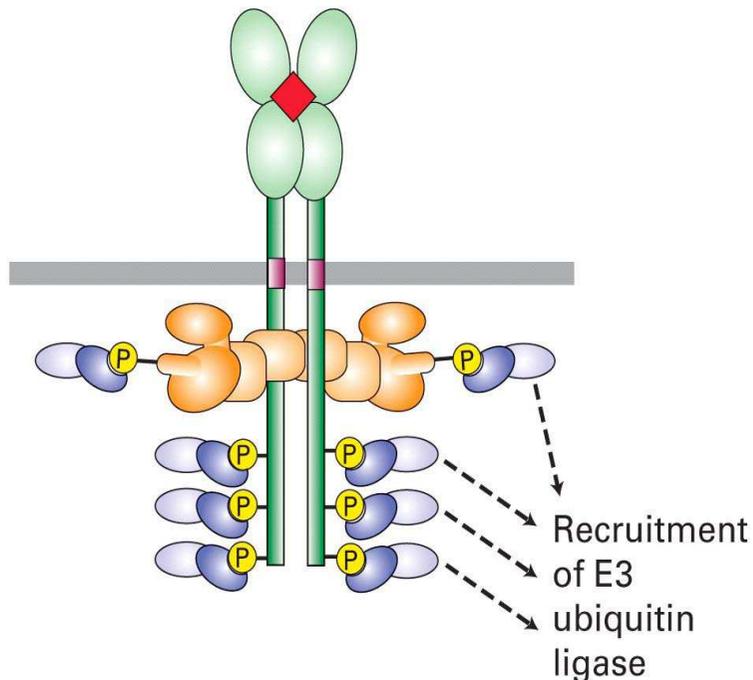


Struttura:

-1 dominio SH2

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

Signal blocking and protein degradation  
induced by SOCS proteins



Meccanismo d'azione:

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

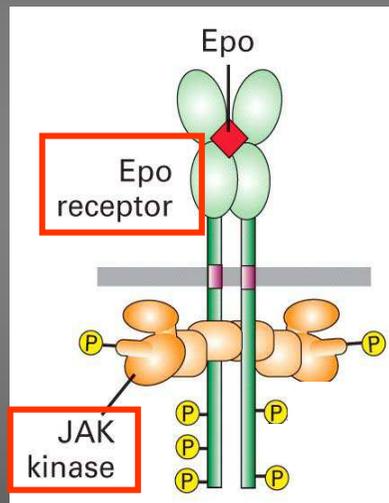
b) Il dominio SOCS richiama E3



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)

EpoR

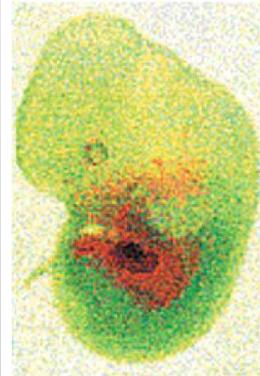


+/+

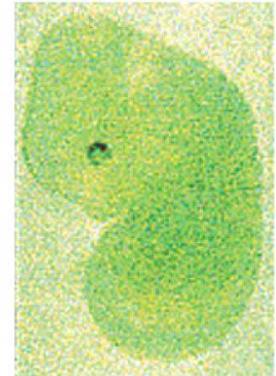


-/-

JAK2



+/+



-/-

## B Hypoxia

