

## La biologia molecolare dell'eritropoietina

Raffaella A. Salvo, Antonietta Mastrone, Angela Spaccamiglio, Loredana Grasso, Paolo Borrione

Consorzio Piemontese Antidoping "Alessandro Bertinaria", Regione Gonzole, Orbassano, Torino

### ABSTRACT

**Molecular biology of erythropoietin.** Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein with a MW of about 30,000 Da. In adult humans, EPO is produced primarily by peritubular cells in the kidneys. The EPO gene has been found on human chromosome 7 (in band 7q21). EPO gene expression is induced by hypoxia-inducible transcription factors (HIF). It has a 165 amino acid chain with four oligosaccharide side chains and circulates in the blood at very low concentrations (~5 pmol/L). Clinical conditions that give rise to tissue hypoxia, including anaemia, lung disease or cyanotic heart disease, lead to increased concentrations of serum EPO. EPO acts by binding to a specific erythropoietin receptor (EPO-R) on the surface of red cell precursors in the bone marrow, stimulating them to transform into mature red blood cells. However, functional EPO-R have recently been demonstrated in various nonhemopoietic tissues indicating that EPO has a more pleiotropic action.

### STRUTTURA

L'eritropoietina (EPO) è una glicoproteina acida sintetizzata principalmente dalle cellule peritubulari della corticale del rene e, in piccola quantità, da altri organi tra cui soprattutto il fegato.

Il gene dell'EPO si trova sul cromosoma 7 (7q11-22) e possiede 5 esoni e 4 introni che trascrivono per un singolo polipeptide di 193 aminoacidi (1,2). Questo polipeptide va incontro a modifiche post-trascrizionali che consistono nella glicosilazione, con addizione di oligosaccaridi di acidi di cui tre N-linked (a livello di Asn-24, Asn-38, e Asn-83) e uno O-linked (a livello di Ser-126), nella formazione di 2 ponti solfuro, il primo tra la Cys-7 e la Cys-161 e il secondo tra la Cys-29 e la Cys-33, e nella rimozione di una sequenza idrofobica secretoria di 27 aminoacidi. Si ipotizza, inoltre, che l'arginina in posizione 166 all'estremità C-terminale venga rimossa prima del rilascio in circolo dell'EPO che presenta, quindi, una struttura primaria formata da 165 aminoacidi. I pesi molecolari della struttura primaria e della forma glicosilata dell'EPO sono rispettivamente di 18 kDa e 30 kDa (3). La glicosilazione dell'EPO ha un ruolo importante nella sua biosintesi, nella sua struttura terziaria e nell'attività biologica in vivo. Inoltre ne condiziona l'emivita in circolo, dalla quale viene prolungata. Esiste un certo grado di eterogeneità della componente glucidica dell'EPO, probabilmente legata alla conformazione della molecola.

Studi di cristallografia (analisi spettrale in dicroismo circolare) hanno messo in evidenza che la struttura secondaria è formata dal 50% di  $\alpha$ -eliche con un arrangiamento spaziale di due paia di  $\beta$ -eliche (A,B,C,D) antiparallele e da due piccoli  $\beta$ -foglietti antiparalleli. Non esistono scorte di EPO preformate a livello tissutale. La sintesi non è influenzata né dall'età, né dal sesso, né dalla sua concentrazione nel plasma, ma deve essere indotta. In condizioni fisiologiche, le concentrazioni dell'ormone rimangono costanti, approssimativamente tra 4 e 26 U/L.

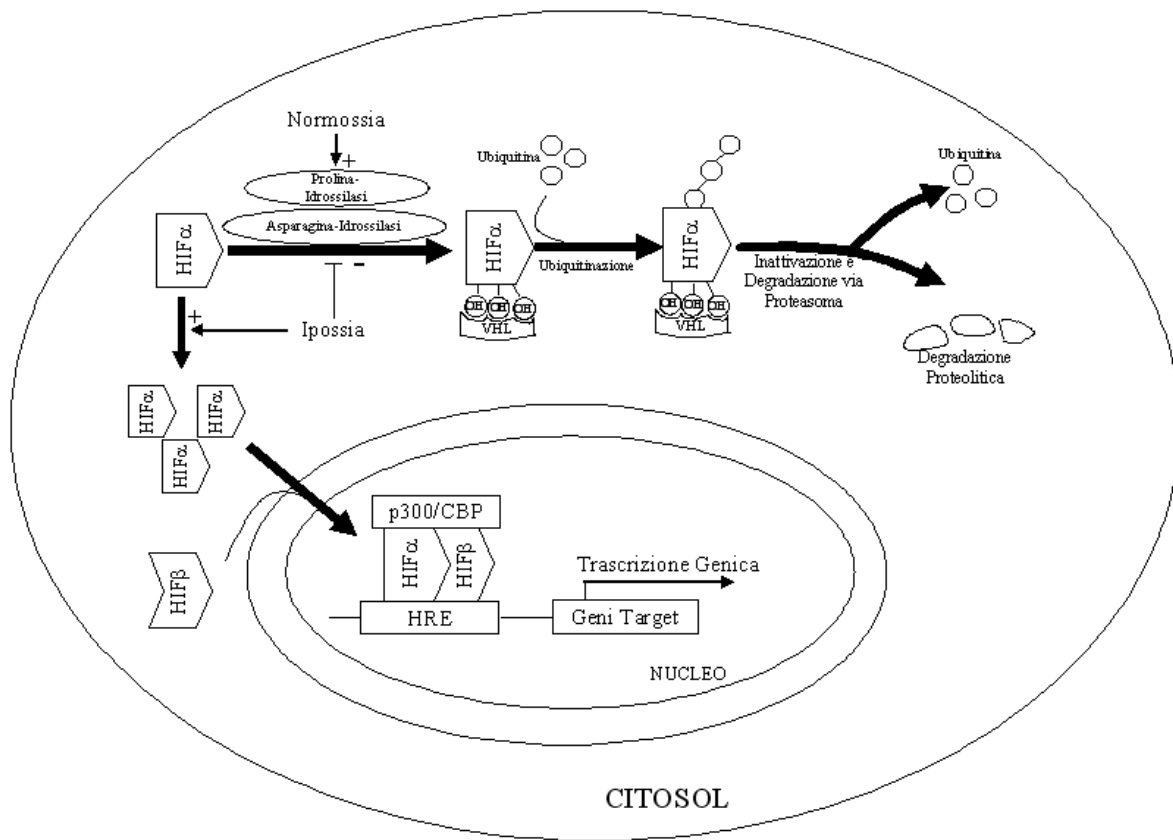
Valori superiori possono essere indice di fattori fisiologici, quali la permanenza ad alta quota, o spia di condizioni patologiche come anemia, tumori renali o epatici, ipossia, emangioblastomi. Concentrazioni inferiori al limite inferiore di riferimento sono invece frequenti in corso di insufficienza renale cronica (4,5).

### CONTROLLO DELL'ESPRESSIONE GENICA DELL'EPO

La sintesi dell'EPO è controllata da un sistema a feedback molto sensibile, in cui un sensore a livello del rene percepisce le alterazioni nell'apporto di ossigeno. Il principale fattore capace di stimolare la sintesi e la secrezione da parte del rene dell'EPO è, infatti, l'ipossia tissutale, dovuta o a ridotta tensione di  $O_2$  nell'ambiente esterno o a ridotta capacità del sangue di trasportare  $O_2$ ; in condizioni di severa ipossia, la produzione di EPO è incrementata fino a mille volte.

Il meccanismo di sintesi (esemplificato nella Figura 1) si basa sulla presenza di un fattore di trascrizione, denominato "Hypoxia-inducible factor" (HIF-1). HIF-1 è una proteina eterodimerica formata da una subunità  $\alpha$  (120 kDa) e da una subunità  $\beta$  (91/94 kDa); entrambe presentano un motivo "helix-loop-helix" e appartengono alla famiglia dei fattori di trascrizione PAS (un acronimo che sta per i primi tre membri di questa famiglia, Per/ARNT/Sim). HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  presentano domini specifici per il legame con il DNA e domini specifici che permettono la dimerizzazione.

Mentre la subunità HIF-1 $\beta$ , comune per molteplici fattori di trascrizione, è espressa in modo costitutivo ed è indipendente dalla tensione di ossigeno, la concentrazione della subunità HIF-1 $\alpha$  in condizioni di normale apporto di ossigeno è mantenuta bassa attraverso un meccanismo finemente regolato. HIF-1 $\alpha$  è instabile in presenza di ossigeno in quanto viene rapidamente degradata attraverso un meccanismo che prevede il coinvolgimen-



**Figura 1**  
 Schema semplificato della via di attivazione del “Hypoxia-inducibile factor” (HIF). Mentre la subunità HIF-1β è prodotta in modo costitutivo, HIF-1α è strettamente regolata dalla pO<sub>2</sub>. In condizioni non ipossiche, HIF-1α è prodotta ma subito degradata via proteasoma, mentre in condizioni ipossiche si accumula rapidamente nelle cellule e può legarsi alla subunità HIF-1β a formare l’eterodimero HIF-1 attivo che viene traslocato nel nucleo.

to dell’enzima “oxygen-dependent prolyl-hydroxylase” (PDH) che modifica la proline 402 e 564 della struttura primaria. Questa modificazione permette il legame della proteina di von Hippel-Lindau (VHL, un gene oncosoppressore) ad HIF-1α. VHL è una ligasi che funziona nel “pathway” dell’ubiquitinizzazione dove lega l’ubiquitina a HIF-1α, mandandola al proteasoma dove viene degradata.

In carenza di ossigeno, invece, le proline 402 e 564 non vengono idrossilate con conseguente stabilizzazione di HIF-1α e accumulo di tale subunità che, in questo modo, può formare, legandosi ad HIF-1β, l’eterodimero funzionalmente attivo. Il fattore di trascrizione formatosi (HIF-1) viene traslocato nel nucleo dove, grazie alla presenza dei co-attivatori p300 e CBP, si lega e attiva promotori (tramite uno o più elementi HRE) di geni coinvolti nei “pathway” cellulari riassunti nella Tabella 1. In questo modo, HIF-1 rappresenta il collegamento tra i sensori per l’O<sub>2</sub> e gli effettori cellulari, locali e sistemici (6- 8).

La sintesi di EPO può essere aumentata anche da condizioni non legate all’ipossia, come quelle associate alla policitemia (causata, ad esempio, da una lunga malattia, disturbi cardiaci congeniti, emoglobinopatie) e a situazioni quali un’alterazione dell’equilibrio acido-base

nel sangue o un intenso esercizio fisico. Nella policitemia vera l’EPO è ridotta e tale dato è patognomonico per questa condizione (9).

**MECCANISMO D’AZIONE**

L’EPO ha caratteristiche peculiari tra i fattori di crescita in quanto presenta un’azione di tipo ormonale. Per svolgere la sua attività (esemplificata nella Figura 2) si lega ad un recettore di superficie (EPO-R). Si tratta di una glicoproteina transmembrana (PM 66-78 kDa) appartenente alla superfamiglia dei recettori per le citochine. Il gene di EPO-R, clonato dall’eritroleucemia murina nel 1989 (10), viene espresso non solo nei precursori eritroidi midollari, ma anche in diversi tessuti non emopoietici come miociti, neuroni corticali, cellule endoteliali, renali e prostatiche ed epiteli mammari e ovarici (11-17). È stato ipotizzato che EPO-R esista sotto forma dimerica quando non è legato all’EPO. Quando si lega all’EPO cambia conformazione (18) e attiva, attraverso l’intervento di una proteinchinasi C, una tirosinchinasi citoplasmatica appartenente alla famiglia delle Janus Chinasi, la JAK2 (Janus Kinase 2) (19).

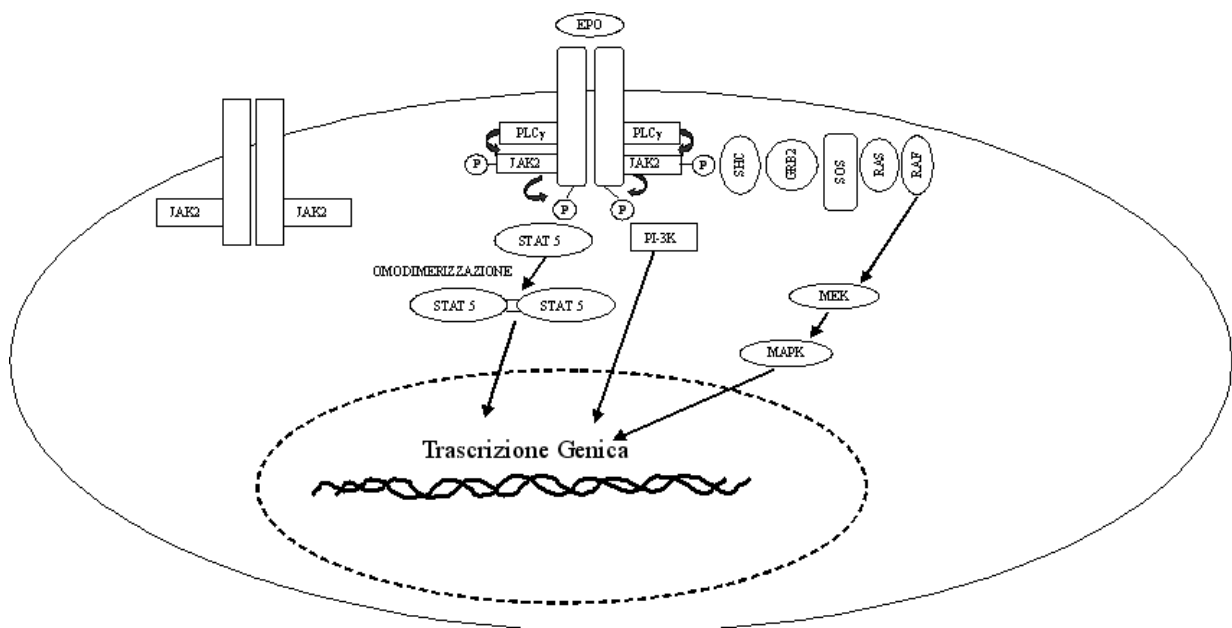
Tutte le JAK possiedono sette domini, definiti “JAK-

**Tabella 1**

Trascrizioni geniche mediate da HIF-1. L'HIF-1 ha due strategie d'azione: la prima permette di aumentare l'O<sub>2</sub> promuovendo l'eritropoiesi, l'angiogenesi e la vasodilatazione; la seconda permette di ridurre il consumo di O<sub>2</sub> mediante il cambiamento del metabolismo per la produzione di ATP da ossidativo (fosforilazione ossidativa) a glicolitico

Angiogenesi	Adattamento metabolico	Sopravvivenza/Proliferazione	Invasione tumorale
VEGF	Enolasi	Eritropoietina	MET
Endogлина	Esocinasi 1,2	IGF-2	MMP-2
Leptina	Glut-1, Glut-3 (trasportatori del glucosio)	TGF- $\alpha$	AMF
TGF- $\beta$ 3	GADPH	Ciclina G2	UPAR
PDGF- $\beta$	Adenilato chinasi 3		Catepsina
NOS			

VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor; TGF- $\beta$  e TGF- $\alpha$ , Transforming Growth Factor- $\beta$  e - $\alpha$ ; PDGF- $\beta$ , Platelet-derived Growth Factor- $\beta$ ; NOS, Nitric Oxide Synthase; GAPDH, Glyceralehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; IGF-2, Insulin-like Growth Factor-2; MET, protooncogene; MMP-2, Matrx Metalloproteinase-2; AMF, Anticholesterolemic Milk Factor; UPAR, Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor.



**Figura 2**

Schema semplificato della via intracellulare attivata da eritropoietina (EPO). EPO legandosi cambia la conformazione del dimero EPO-R cui segue trasfosforilazione ed attivazione di JAK2; questa a sua volta fosforila residui tirosinici su EPO-R con creazione di siti d'attacco (P) per i domini SH2 di alcuni trasduttori come STAT5. Inoltre si ha l'attivazione di PI-3K (Phosphatidylinositol-3-kinase) e la fosforilazione di SHC (adapter protein, SRC-Homology and collagen) che forma un complesso con GRB (Growth factor receptor binding protein), con SOS (Son of sevenless) e la G-protein RAS. Tale complesso porta alla sequenziale attivazione di serine chinasi (RAF, MEK e infine MAPK).

Homology" (JH). Al C-terminale si trova JH1 che è il dominio catalitico tirosinchinasico e, adiacente ad esso, si trova il dominio JH2: una pseudochinasi con ruolo regolatorio (20); JH3, 4, 5, 6 e 7 sono domini necessari per il legame all'EPO e per la corretta processazione nell'apparato del Golgi (21).

JAK2 fosforila otto residui tirosinici presenti nella faccia citoplasmatica di EPO-R (22,23). Studi hanno dimo-

strato il coinvolgimento anche di altre tirosinchinasi: Lyn ("LCK/Yes-related novel tyrosine kinase") e Btk ("Burton's tyrosine kinase") responsabili della fosforilazione dei residui Y460, Y464 e Y479 di EPO-R (24).

Le tirosine fosforilate agiscono da siti di aggancio per proteine segnale che presentano domini SH2 (SRC Homology 2), come alcuni fattori di trascrizione STAT ("Signal Transducer and Activator of Transcription" 1, 3,

5A, 5B). Queste proteine giocano un ruolo nella trasmissione dei segnali attivati dalle citochine (4, 25). Studi *in vitro* su culture cellulari hanno dimostrato che EPO è in grado di attivare STAT1, STAT3 e STAT5 A/B (26-28), portando alla trascrizione di diversi geni target tra cui il gene *Bcl-x<sub>L</sub>* con azione antiapoptotica, i geni per le Cicline D1, che stimolano la progressione nel ciclo cellulare, geni eritrospecifici (come le globine) e geni che codificano per le SOCS, proteine coinvolte nella terminazione del segnale (26-28).

Esistono altre probabili vie attivate da EPO-R che dipendono da proteine MAPK ("Mitogen-activated protein kinases") quali Erk1/2 ("Extracellular-regulated kinases" 1/2), SAPK/JNK ("SAP Kinase/Jun Kinase") e p38: la via Erk1/2 ha un ruolo nella mitosi; mentre più complicato è il ruolo delle vie SAPK/JNK e p38. Uno dei primi ruoli descritti di SAPK/JNK e p38 fu il coinvolgimento di tali chinasi nella risposta allo stress. Inoltre EPO porta ad una maggiore sopravvivenza cellulare attivando direttamente la cascata del fosfatidilinositolo (PI3-Kinase) attraverso il reclutamento della proteina p85 (27).

L'EPO è in grado di stimolare un flusso di Ca<sup>2+</sup> necessario per la differenziazione cellulare. È stato, infatti, visto che la coespressione di TRPC2 (membro della famiglia "Transient Receptor Potential Channel") con EPO-R nelle cellule CHO ("Chinese Hamster Ovary") porta ad un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracitoplasmatico in risposta all'EPO (29).

Esistono due vie di spegnimento del segnale: una a breve termine e l'altra a lungo termine. La prima coinvolge una SHP1 fosfatasi che disattiva JAK2; l'altra prevede l'intervento di proteine SOCS che si legano ai residui di tirosina fosforilati di EPO-R, impedendo il legame con STAT. Si ottiene anche l'attivazione di E3 ubiquitina ligasi che porta a degradazione proteosomica di JAK.

L'EPO agisce nel midollo osseo sinergicamente con diversi fattori di crescita (SCF, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-9 e IGF-1) nel determinare la maturazione dei progenitori eritroidi stimolando, in questo modo, l'eritropoiesi (30). I primi progenitori eritroidi commissionati sono definiti come BFU-E ("burst-forming unit-erythroid"). Tali cellule, caratterizzate da un alto potenziale proliferativo, presentano un basso numero di recettori per l'EPO; durante la maturazione esse perdono gradualmente la loro capacità proliferativa ed EPO-R aumenta di numero. Lo stadio successivo è rappresentato dalle cellule definite come CFU-E ("colony-forming unit-erythroid") che presentano, insieme allo stadio successivo di pronormoblasti, il numero più alto di EPO-R. Studi hanno rivelato che il numero di recettori per tali cellule è all'incirca 1000/cellula (30) e che tale numero, negli stadi successivi, diminuisce gradualmente. Né reticolociti né eritrociti contengono EPO-R (31-33). L'eritropoietina agisce soltanto sulle cellule più adatte, essendo in grado di diminuirne l'apoptosi, consentendo solo a queste di passare attraverso le differenti linee di maturazione e di diventare eritrociti (34).

La presenza di EPO-R in altri tessuti ha permesso di ipotizzare che l'EPO abbia un'azione pleiotropica: ad esempio, sembra avere un ruolo fisiologico nello svilup-

po del cervello (35). L'EPO protegge i tessuti cardiaci e nervosi dall'infiammazione e dal danno ischemico, sia attraverso la stimolazione diretta delle cellule nervose e cardiache, che indirettamente attraverso la mobilitazione delle cellule progenitrici endoteliali promuovendo, così, la neovascolarizzazione (36-38).

## BIBLIOGRAFIA

- Jelkman W. Erythropoietin: structure, control of production and function. *Physiol Rev* 1992;72:449-89.
- Law ML, Cai GY, Lin FK, et al. Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6920-4.
- Inoue N, Takeuchi M, Olashi H, et al. The production of recombinant human erythropoietin. *Biotechnology Annual Review* 1995;1:297-313.
- Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* 2003;228:1-14.
- Nangaku M, Eckardt KU. Pathogenesis of renal anemia. *Semin Nephrol* 2006;26:261-8.
- Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Biology of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol* 2001;502:169-87.
- Bruick RK, McKnight SL. Oxygen sensing gets a second wind. *Science* 2002;295:807-8.
- Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004;43:649-59.
- Eckardt KU, Kurtz A. Regulation of erythropoietin production. *Eur J Clin Invest* 2005;35:13-9.
- D'Andrea AD, Lodish HF, Wong GC. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 1989;57:277-85.
- Marti HH, Bernaudin M, Petit E, et al. Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol Sci* 2000;15:225-9.
- Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak-2 and NFκB signaling cascades. *Nature* 2001;412:641-7.
- Mulcahy L. The erythropoietin receptor. *Semin Oncol* 2001;28:19-23.
- Grimm C, Wenzel A, Groszer M, et al. HIF-1 induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nature Med* 2002;8:718-24.
- Westenfelder C. Unexpected renal actions of erythropoietin. *Exp Nephrol* 2002;10:294-8.
- Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 2003;112:999-1007.
- Terri DR, Choan M, Barber DL. Turning cell red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 2005;15:146-55.
- Philo JS, Aoki KH, Arwaws T, et al. Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (Epo) receptor. *Biochemistry* 1996;35:1681-91.
- von Lindern M, Parren-van Amelsvoort M, van Dijk T, et al. Protein kinase C alpha controls erythropoietin receptor signaling. *J Biol Chem* 2000;275:34719-27.
- Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000;20:3387-95.
- Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 2001;8:1327-38.
- Miura O, D'Andrea A, Kabat D, et al. Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol Cell Biol* 1991;11:4895-902.

- 23 Yoshimura A, Lodish HF. In vitro phosphorylation of the erythropoietin receptor and an associated protein, pp130. *Mol Cell Biol* 1992;12:706-15.
- 24 Schmidt U, van den Akker E, Parren-van Amelsvoort M, et al. Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in erythroid progenitors. *J Exp Med* 2004;199:785-95.
- 25 Bouscary D, Pene F, Claessens Y-E, et al. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* 2003;101:3436-43.
- 26 Constantinescu SN, Ghaffari S, Lodish HF. The erythropoietin receptor: structure, activation and intracellular signal transduction. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:18-23.
- 27 Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, et al. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 1999;253:143-56.
- 28 Cheung JY, Miller BA. Molecular mechanism of erythropoietin signalling. *Nephron* 2001;87:215-22.
- 29 Chu X, Tong Q, Cheung JY, et al. Interaction of TRPC2 and TRPC6 in erythropoietin modulation of calcium influx. *J Biol Chem* 2004;279:10514-22.
- 30 D'Andrea AD, Zon LI. Erythropoietin receptor: colon subunit structure and activation. *J Clin Invest* 1990;86: 681-7.
- 31 Sawyer ST, Koury MJ. Erythropoietin requirement during terminal erythroid differentiation: the role of surface receptors for erythropoietin. *J Cell Biol* 1987;105:1077.
- 32 Sawada K, Krantz SB, Dai C-H, et al. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptor. *J Cell Physiol* 1990;142:219-30.
- 33 Wickrema A, Krantz SB, Winkelmann JC, et al. Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells. *Blood* 1992;80:1940-9.
- 34 Wu H, Kingmuller U, Besmer P, et al. Interaction of the erythropoietin and stem-cell factors. *Nature* 1995;377: 242-6.
- 35 Chen ZY, Warin R, Noguchi CT. Erythropoietin and normal brain development: receptor expression determines multi-tissue response. *Neurodegener Dis* 2006;3:68-75.
- 36 Coussons PJ, Baig S, Fanutti C, et al. Novel tissue remodelling roles for human recombinant erythropoietin. *Biochem Soc Trans* 2005;3:1129-30.
- 37 Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Ribouot C. Erythropoietin and myocardial protection: what's new? *Fundam Clin Pharmacol* 2005;19:439-46.
- 38 Hirata A, Minamino T, Asanuma H, et al. Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:185-6.