

HIF- α : il nuovo target per il trattamento dell'anemia nella MRC. Aspetti molecolari della via di attivazione sequenze HREs

In depth review

Fabio Mazza¹, Angela Cicciarelli¹, Filomena Rubino¹, Francesca Apponi², Ernesto Anselmo Cioffi¹, Roberto Simonelli³

1 UO Nefrologia e Dialisi, Ospedale SS Trinità Sora, Italia

2 UO Nefrologia e Dialisi, Ospedale Fabrizio Spaziani Frosinone, Italia

3 UO Nefrologia e Dialisi, Ospedale di Cassino, Italia

Corrispondenza a:

Fabio Mazza

UO *Nefrologia e Dialisi*, Ospedale SS Trinità Sora, Italia

Località San Marciano

03039 Sora (FR), Italia

Tel/Fax 07768294193

E-mail: fabio.mazza@aslfrosinone.it



Fabio Mazza

ABSTRACT

Roxadustat è un inibitore reversibile della prolin-idrossilasi (PHD) del fattore inducibile dell'ipossia, somministrato per via orale, approvato recentemente in Italia per la sua sicurezza ed efficacia nel trattamento dell'anemia secondaria a malattia renale. Lo scopo di questo articolo è illustrare i principali meccanismi molecolari responsabili dell'attivazione dei geni HREs, che hanno catturato l'attenzione dei nefrologi.

PAROLE CHIAVE: Roxadustat, EPO, HIF, fibrosi, infiammazione, stress ossidativo

Introduzione

Il fattore inducibile dell'ipossia (HIF), antico sistema biologico con lo scopo di proteggere l'organismo dai danni dell'ipossia acuta e cronica, è il regolatore chiave della risposta alle variazioni della pressione parziale dell'ossigeno nel sangue dei mammiferi [1]. L'omeostasi dell'ossigeno è fondamentale per il corretto sviluppo nelle varie fasi della vita: dalla gestazione intrauterina (una bassa tensione di ossigeno durante lo sviluppo embrionale e fetale è essenziale per processi come vasculogenesi e angiogenesi) alla vita adulta [2]. La proteina HIF è un fattore di trascrizione elica-loop-elica, molecola eterodimero costituita da una subunità α ossigeno sensitiva e una subunità β costitutiva chiamata anche idrocarburo arilico traslocatore nucleare del recettore (ARNT) [3]. L'attività di HIF- α è direttamente regolata dal dominio strutturale della prolil-idrossilasi (PHD), un enzima sensibile alle variazioni di ossigeno [4]. Sono stati identificati 3 isoforme di PHD: PHD1, PHD2, PHD3, e 3 di HIF- α : HIF-1 α (826 aa), HIF-2 α (870 aa), HIF-3 α (557 aa) e un solo sottotipo di HIF- β (789 aa) [5]. HIF-1 α e HIF-2 α presentano una similitudine del 85%. La struttura di HIF- α è caratterizzata dalla presenza di domini: bHLH e PAS, presenti in tutte le isoforme, responsabili dell'interazione con il DNA, N-TAD e C-TAD, chiamati anche domini ODDD (degradazione ossigeno-dipendente) fondamentali per l'espressione di geni in risposta all'ipossia [6, 7]. HIF-3 α non esprime il dominio C-TAD (essenziale per corretto riconoscimento con il complesso di trascrizione P300/CBP), per tale motivo sembra non essere coinvolto in nessun processo trascrizionale (figura 1) [8].

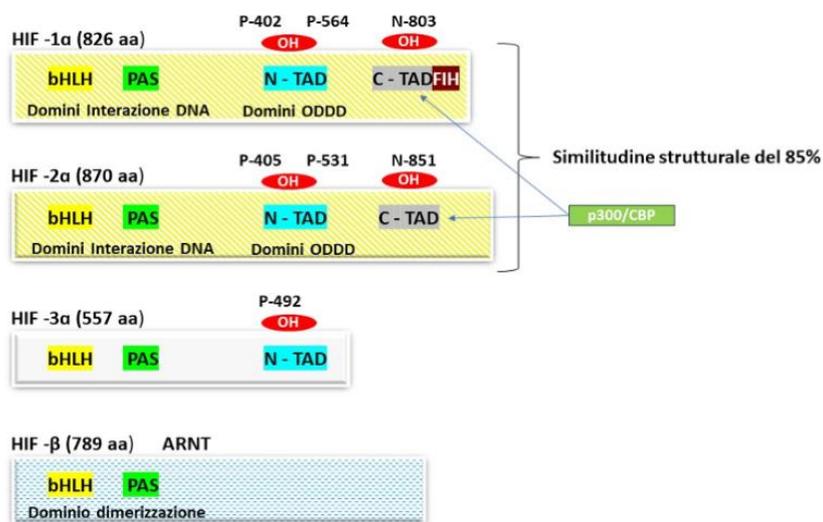


Figura 1. Rappresentazione strutturale semplificata delle isoforme HIF- α : HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α e HIF-1 β . bHLH-PAS: dominio basico elica-loop-elica, responsabile del cambiamento conformazionale della struttura per interagire alla sequenza HREs (elementi di risposta all'ipossia); TAD: dominio di trans-attivazione in N e C terminale, essenziali per l'espressione geni HREs); ODDD: dominio di degradazione ossigeno dipendente, oggetto di idrossilazione da parte della PHD (prolina idrossilasi); p300/CBP: complesso proteico trascrizionale riconosciuto solamente da C-TAD. Sono rappresentati le proline idrossilate dalla PHD. ARNT: idrocarburo arilico traslocatore nucleare del recettore. Vedere il testo per i dettagli.

Se i livelli di ossigeno sono normali, HIF- α è continuamente degradata attraverso 2 vie: funzionale e conformazionale [9]. In condizioni di normossia, la PHD è responsabile della idrossilazione del dominio ODDD della prolina 402, 564 e 803 (HIF-1 α) e della prolina 405, 531 e 851 (HIF-2 α), impedendo il legame al coattivatore trascrizionale p300/CBP, essenziale per il riconoscimento delle sequenze HREs (elementi di risposta all'ipossia) sul DNA da parte della polimerasi (via funzionale) [10]. L'idrossilazione delle proline determina un cambiamento conformazionale di HIF- α tale da essere riconosciuta dalla proteina pVHL (von Hippel-Lindau) in complesso con elonghina B, C e

ubiquitina (via conformazionale) [11]. L'ubiquitinazione così ottenuta, sarà responsabile della degradazione proteasomica di HIF- α (il tempo stimato per la sua completa degradazione è di 5 minuti) (figura 2a) [12]. In caso di ipossia, le idrossilasi non funzioneranno, i domini ODDD della subunità α non verranno idrossilate, HIF- α si accumulerà nel citoplasma, formerà un dimero con HIF- β , tale complesso deve essere stabilizzato dal coattivatore trascrizionale p300/CBP, il quale funziona come un ponte proteico tra HIF- α e HIF- β [13]. Il complesso così formato HIF α /HIF β /p300/CBP può traslocare nel nucleo interagendo con le sequenze HREs [14]. I geni target si dividono in quelli regolati dalla prolil-idrossilasi sulla porzione N-TAD e quelli regolati dal fattore inibente FIH sulla porzione finale C-TAD [15]. In caso di ipossia moderata è inibita solamente l'attività della PHD, verranno così espressi solamente i geni dell'N terminale del dominio N-TAD (figura 2b), in caso di ipossia grave verrà inibito anche FIH, con espressione dei geni sulla porzione C-TAD (figura 2c) [16]. HIF-1 α (regolata principalmente dalla PHD2), viene espressa in quasi tutti i tipi di cellule, attivando la trascrizione di numerosi geni coinvolti in diversi processi metabolici (lipidi, metabolismo mitocondriale ed energetico) e fisiologici (angiogenesi e infiammazione) [17]. HIF-2 α , regolata dalla PHD1, PHD2 e PHD3, viene espressa in un gruppo limitato di cellule (principalmente renali ed epatiche), influenza principalmente la trascrizione dei geni coinvolti nell'eritropoiesi, stimolando la produzione di eritropoietina endogena, incluse le proteine coinvolte nel trasporto del ferro [18]. Il ruolo della HIF 3 α non è stato ancora chiarito [19].

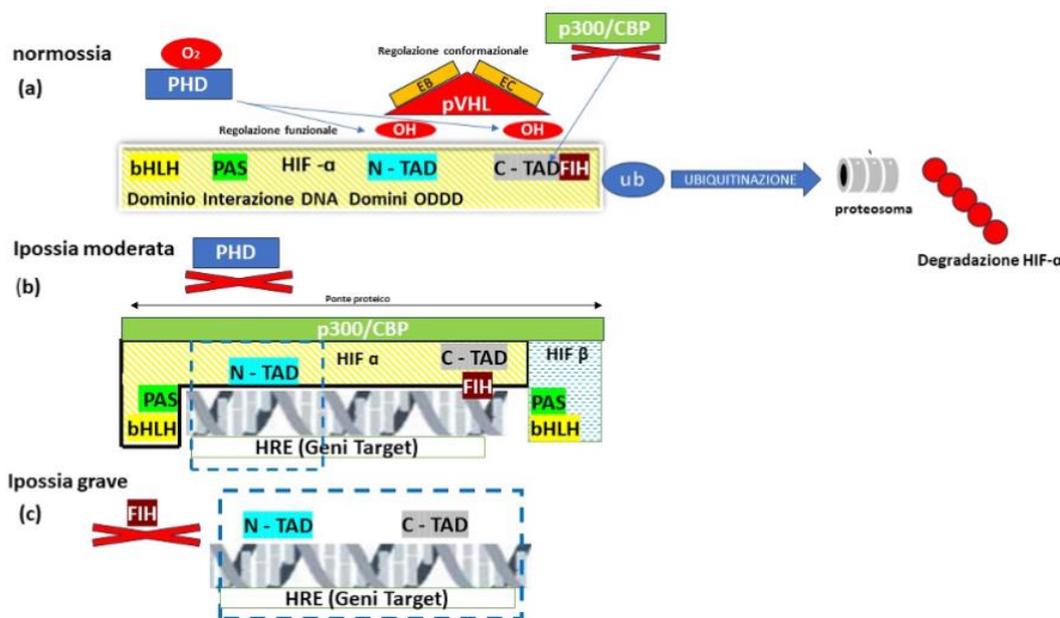


Figura 2. In condizioni di normossia (a), le proline del dominio TAD saranno idrolizzate dalla PHD (regolazione funzionale); tale processo impedisce non solo l'interazione di C-TAD con p300/CPB, ma causa un cambiamento conformazionale (regolazione conformazionale) tale che HIF- α sarà riconosciuta dalla proteina pVHL (von Hippel-Lindau) in complesso con elonghina B e C (arancione). Questo complesso lega ubiquitina (ub) ad HIF- α per avviare il processo di ubiquitinazione e degradazione proteasomica. In condizioni di ipossia moderata, (b) le PHD non funzioneranno, p300/CPB legandosi alla C-TAD, stabilizzerà il complesso HIF- α /HIF- β , formando "un ponte proteico", solamente il dominio N-TAD esprime i geni HREs (tratteggiato il blu), mentre C-TAD è ancora inibito da FIH (fattore inibente). In caso di ipossia grave (c) viene inibito anche FIH con espressione dei geni C-TAD.

Effetti di HIF- α sulla regolazione dell'espressione del gene dell'eritropoietina (EPO)

EPO è un ormone glicoproteico, prodotto principalmente dalle cellule interstiziali del rene e in misura minore dal fegato e dal cervello [20]. Una volta rilasciato nel sangue, raggiunge il midollo osseo dove esplica la sua funzione di promotore di proliferazione e differenziazione delle cellule

progenitrici degli eritroblasti fino alla formazione di eritrociti maturi [21–23]. L’ipossia rappresenta il maggiore stimolo alla increzione di EPO attraverso la stabilizzazione di HIF-2 α dovuta da inibizione della PHD2. HIF-2 α , risulta espresso nelle cellule endoteliali, interstiziali, glomerulari del rene e negli epatociti, svolgendo un ruolo importante nella produzione di eritropoietina endogena [24]. A conferma di ciò, studi su modelli animali, mediante tecnica di delezione molecolare, hanno dimostrato lo sviluppo di una grave eritrocitosi con un aumento di 10 volte della concentrazione di EPO nel plasma sanguigno in topi *Knockout* per il gene PHD2 rispetto ai topi *wild type* [25]. Negli umani, è stata osservata una selezione positiva del polimorfismo adattativo per ridotta attività di PHD2, responsabile di una maggiore espressione di HIF-2 α , in popolazioni che vivono ad alta quota, come i tibetani e gli andini, rispetto a coloro che vivono in pianura [26]. L’inibizione della prolina idrossilasi (PHD2) favorisce la formazione del complesso HIF-2 α /HIF- β /p300/CBP, il quale ha bisogno della cooperazione funzionale di altri 2 fattori trascrizionali: HNF-4 (fattore nucleare tessuto specifico espresso sia nelle cellule epatiche che renali) e il fattore Sp1 (fattore di trascrizione ubiquitario) [27–29]. Il complesso così formato permette il corretto riconoscimento delle sequenze HREs per una regolazione tessuto specifica epato-renale di EPO (figura 3a). A conferma di ciò, è stato dimostrato che mutazioni *non senso* a carico di HNF-4 e Sp1 inibiscono l’induzione di EPO in condizioni ipossiche [30]. Questi studi confermano il ruolo di HIF-2 α nella sintesi di eritropoietina epatica, che rappresenta la principale fonte di EPO durante lo sviluppo embrionale [31]. Sebbene il fegato non contribuisca al mantenimento dei livelli di EPO negli adulti, la sintesi di EPO dal tessuto epatico può essere riattivata in condizioni di ipossia moderata o grave [32]. Inoltre, è stato osservato che una frazione significativa di EPO deriverebbe proprio dal fegato a seguito di inibizione reversibile non ipossica di PHD2, in soggetti adulti affetti da malattia renale cronica terminale in trattamento emodialitico (con significativa degradazione del parenchima renale) oppure in pazienti nefrectomizzati [33, 34].

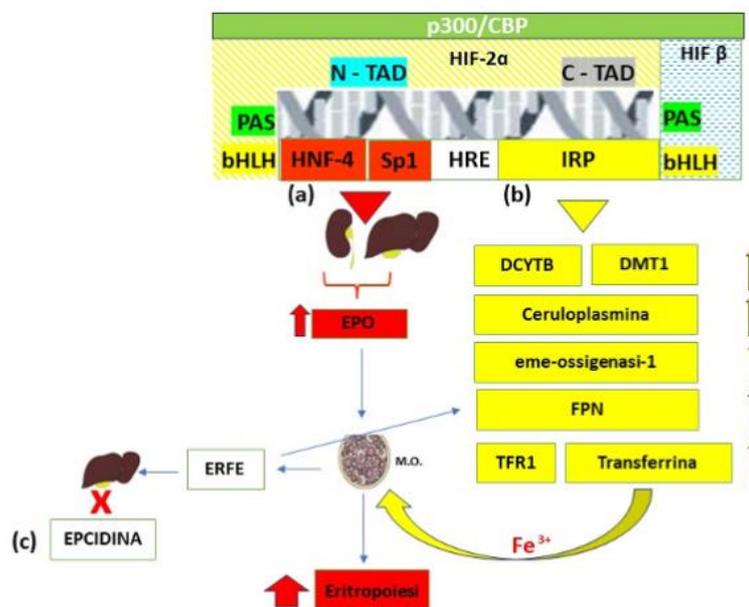


Figura 3. Rappresentazione dei fattori trascrizionali identificati coinvolti nell'eritropoiesi: HNF-4 (fattore nucleare tessuto specifico espresso sia nelle cellule epatiche che renali) e Sp1 (ubiquitario) (a), essenziali per la regolazione tessuto specifica epato-renale di EPO, IRP (proteine regolatrici del ferro) (b). La soppressione della trascrizione di epcidina da parte di ERFE (eritroferrone) prodotto dalla stimolazione EPO mediata da HIF-2 α (c). DCYTB: citocromo b duodenale; DMT1: trasportatore di metallo bivalente; FPN: ferroportina; TFR1: recettore della transferrina; MO: midollo osseo.

Effetti di HIF- α sul metabolismo del ferro

HIF- α coordina l'eritropoiesi influenzando anche il metabolismo del ferro attraverso l'assorbimento e il suo trasporto [35]. L'inibizione di PHD stabilizza il complesso HIF-2 α /HIF- β /p300/CBP, il quale ha bisogno della cooperazione delle proteine regolatrici del ferro (IRP), responsabili dell'espressione dei geni della regione 5' dell'esone HRE, coinvolti nel trasporto e riassorbimento del ferro (figura 3b) [36]. Recenti studi dimostrano che HIF-2 α incrementa la trascrizione del citocromo b duodenale (DCYTB), enzima ferrico reduttasi sito nell'orletto a spazzola della superficie luminale degli enterociti che riduce Fe³⁺ (ferro ferrico) in Fe²⁺ (ferro ferroso), del trasportatore di metallo bivalente (DMT1), responsabile dell'assorbimento del ferro nella forma ferrosa [37]. Inoltre, aumenta l'espressione della ceruloplasmina, responsabile non solo dell'ossidazione del ferro ma anche coinvolta nel metabolismo del rame, eme-ossigenasi-1, implicato nel riciclare il ferro proveniente da eritrociti fagocitati, ferroportina (FPN) unico noto esportatore di ferro cellulare, transferrina, che trasporta il ferro nella sua forma ferrica (Fe³⁺) nel sangue, infine il recettore della transferrina TFR1 [38–41].

L'FPN è il bersaglio di degradazione da parte dell'epcidina, un piccolo peptide di 25 aminoacidi, prodotto dagli epatociti. L'espressione dell'epcidina è indotta da eccessi di ferro e citochine infiammatorie, mentre viene repressa da anemia e ipossia. Poiché l'epcidina sopprime l'espressione della FPN, elevati livelli di epcidina sono responsabili di alterato rilascio di ferro dalle riserve interne [42]. Nei pazienti con insufficienza renale cronica avanzata, i livelli plasmatici di epcidina sono frequentemente aumentati contribuendo alla patogenesi dell'anemia renale da scarsa mobilizzazione di riserve marziali [43]. Con l'attivazione sistemica di HIF-2 α , si osserva una riduzione dei livelli epcidina nel fegato incrementando l'assorbimento del ferro e anche la sua mobilitazione [44]. Sebbene studi iniziali suggerissero un ruolo diretto di HIF-2 α sulla soppressione della trascrizione dell'epcidina, successive analisi su modelli murini dimostrerebbero che essa stessa sarebbe inibita dall'eritroferone, ormone proteico, prodotto dall'eritropoietina in risposta alla stimolazione EPO-mediata da HIF-2 α [45]. I risultati dello studio di Liu e collaboratori confermano quanto appena detto: in topi *Knockout* per HIF-2 α , la sola stabilizzazione di HIF-1 α non determina la soppressione di epcidina (Hamp1), viceversa, in topi *Knockout* per HIF-1 α , l'attivazione di HIF-2 α , con relativa induzione di EPO, è associata alla downregulation dell'espressione di Hamp1. Infine, nei topi sottoposti a sola inibizione farmacologica di EPO, nonostante l'attivazione di HIF-2 α , non si assiste alla soppressione dell'epcidina [46]. ERFE potenzia l'attività della ferroportina, aumentando l'assorbimento di ferro dall'intestino e la sua mobilitazione dai depositi per la sintesi dell'emoglobina, per cui HIF-2 α non agisce come un diretto repressore della trascrizione dell'epcidina epatica (figura 3c) [47].

Effetti di HIF- α sul metabolismo dei lipidi

Il metabolismo del colesterolo è regolato dal 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA-reduttasi (HMG-CoA reduttasi), un enzima limitante la biosintesi del colesterolo [48]. La sintesi del colesterolo è un processo che consuma molto ossigeno: 11 molecole di ossigeno per 1 molecola di colesterolo prodotto [49]. Di conseguenza, la privazione dell'ossigeno (ipossia) limita la sintesi del colesterolo, attraverso meccanismi non completamente compresi, coinvolgendo HIF-1 α che stimola la trascrizione del gene INSIG-2 [50]. La proteina Insig-2 si lega a HMG-CoA reduttasi e innesca la sua ubiquitazione e degradazione accelerata, contribuendo a una significativa riduzione della colesterolemia totale (figura 4a). Si tratta dunque di un processo fisiologico feedback negativo controllato, per proteggere la cellula dal consumo dispendioso di ossigeno durante l'ipossia [51]. Recenti studi hanno dimostrato che HIF-2 α interferisce con l'attività dei recettori scavenger SR-B1 attenuando così la degradazione di colesterolo HDL, contribuendo ad aumenti del colesterolo HDL

ematico [52]. Numerosi dati confermano una riduzione significativa della trigliceridemia secondaria al trattamento con Roxadustat [53]. Un ruolo chiave nella biosintesi dei lipidi è svolto dalle lipine, una famiglia di proteine con attività fosfatidato fosfatasi Mg^{2+} -dipendente (PAP1) che catalizzano la conversione dell'acido fosfatidico (PA) in diacilglicerolo (DAG) nella penultima fase della sintesi dei trigliceridi [54]. Il gene della lipina 1 è direttamente controllato da HIF-1 α e la sua *up-regulation* è correlata all'accumulo intracellulare dei trigliceridi, contribuendo così alla loro riduzione ematica, suggerendo che la lipina 1 è un importante mediatore dell'adattamento metabolico cellulare in risposta all'ipossia (figura 4 b) [55]. È noto che l'esposizione delle cellule a lieve ipossia comporta a una limitazione di nutrienti, la cellula dunque si difende, immagazzinando glucosio per un uso successivo come fonte di energia anaerobica [56]. Al contrario, i lipidi possono produrre energia solo attraverso la fosforilazione ossidativa, un processo drasticamente inibito da una grave ipossia. L'immagazzinamento dei trigliceridi sotto forma di goccioline lipidiche in condizioni di ipossia, potrebbe essere interpretata come una possibile risposta cellulare per tamponare la tossicità causata dall'accumulo di prodotti derivanti dalla glicolisi anaerobica [57, 58]. Questi risultati indicano che la stabilizzazione di HIF- α potrebbe essere sfruttata per futuri trattamenti terapeutici come la steatosi epatica secondaria a severa dislipidemia e nella prevenzione di malattie cardiovascolari [59].

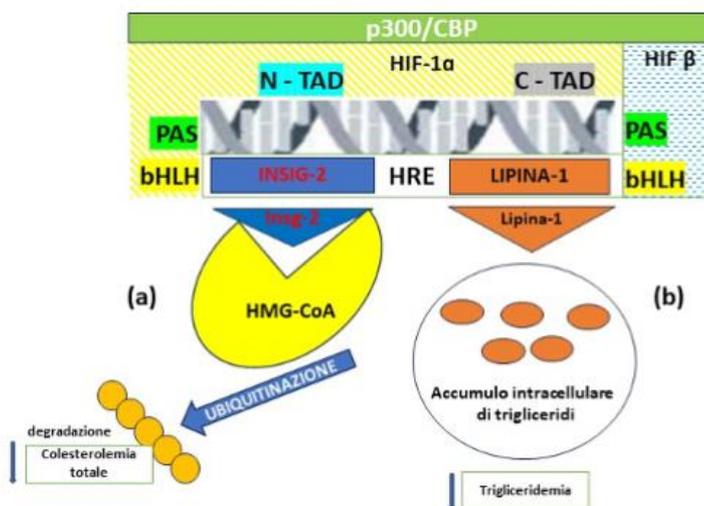


Figura 4. Il legame tra la proteina Insig-2, con HMG-CoA reduttasi (a) avvia il processo di ubiquitinazione e degradazione contribuendo alla riduzione della colesterolemia totale ematica. HIF-1 α controlla direttamente la Lipina1 (b) responsabile dell'accumulo intracellulare dei trigliceridi sotto forma di goccioline lipidiche contribuendo così alla loro riduzione ematica. HMG-CoA reduttasi: 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA-reduttasi, gene INSIG-2, gene LIPINA-1.

Effetti di HIF- α sulla fibrosi renale e polmonare

Il trattamento della fibrosi tissutale, presente nella maggior parte delle malattie croniche, rimane tutt'ora impegnativo. Numerosi studi su modelli animali hanno confermato l'influenza di HIF- α nei confronti di processi molecolari responsabili della fibrosi renale e polmonare [60]. Diversi lavori suggeriscono che l'attivazione di HIF- α per brevi periodi possa contribuire a rallentare l'evoluzione della fibrosi renale in modelli animali sottoposti a nefrectomia subtotala [61]. Xue Li e collaboratori, hanno riportato dati che confermano il ruolo di Roxadustat nell'attivare il fattore nucleare eritroide 2 (Nrf2) [62]. Nrf2 è un importante regolatore della sequenza promotrice ARE, nota come elemento di risposta antiossidante che codifica l'espressione di enzimi antiossidanti e detossificanti [63].

Quando Nrf2 è inattivo, non compie nessuna azione poiché interagisce con la proteina Keap1 per essere degradata rapidamente, attraverso il sistema di ubiquitinazione (figura 5 a) [64]. La presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS), peculiari dello stress ossidativo, l'inibizione non ipossica della PHD, attivano la proteina Nrf2, la quale si dissocia da Keap1, per essere fosforilata e trasportata nel nucleo, ove si combina con la proteina Maf per formare un dimero che legandosi alla sequenza ARE avvia alla risposta antiossidante caratterizzata non solo dalla riduzione della sintesi di proteine profibrotiche quali la fibronectina, collagene IV, vimentina, ma anche da un aumento della concentrazione del complesso proteico Akt/GSK-3 β , responsabile della inibizione della ferroptosi e infiammazione (figura 5b) [65]. Lo stress ossidativo e l'infiammazione sono caratteristiche comuni nella malattia renale cronica (CKD), per tale motivo gli inibitori HIF- α potrebbero avere un ruolo protettivo nei confronti della fibrosi renale oltre alla correzione dell'anemia. Sono disponibili in letteratura diversi lavori che cercano di chiarire il ruolo protettivo di Roxadustat nei confronti della progressione della fibrosi polmonare. Recenti dati dimostrano che Roxadustat inibisce l'espressione della proteina segnale intracellulare p-Smad3 responsabile dell'attivazione del fattore di crescita profibrotico TGF- β 1 [66]. Il complesso TGF β 1/Smad3 attiva l'espressione di geni profibrotici quali collegene I e III, α SMA (alpha-smooth muscle actin), Ctgf che sono responsabili della progressione della fibrosi polmonare (figura 5 c) [67].

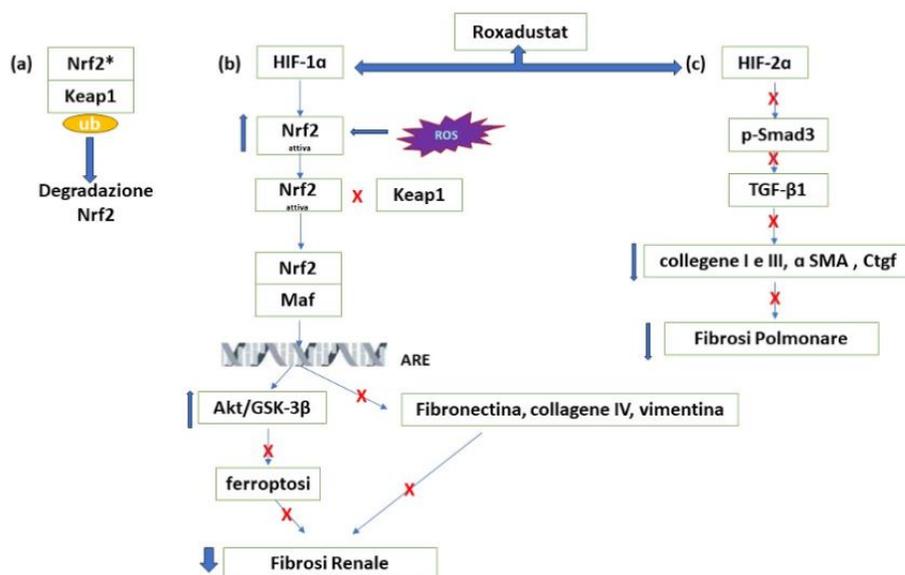


Figura 5. Effetti differenti di Roxadustat sulla fibrosi renale e polmonare secondo le isoforme HIF- α coinvolte. Nrf2* non attiva dimerizza con Keap1 per essere degradata (a). HIF-1 α e ROS attivano Nrf2 (b), una volta attivato si dissocia da Keap1 per formare il complesso Nrf2/Maf che legandosi alla sequenza ARE (elementi di risposta antiossidante) avvia alla risposta antiossidante contribuendo al rallentamento della progressione della fibrosi renale. HIF-2 α inibisce l'espressione della proteina segnale intracellulare p-Smad3 responsabile dell'attivazione del fattore di crescita profibrotico TGF- β 1 contribuendo alla prevenzione di sviluppo di fibrosi polmonare (c). Nrf2: fattore nucleare eritroide 2, SMA: alpha-smooth muscle actin, AKT/GSK-3 β : complesso molecolare responsabile del segnale inibitorio della ferroptosi.

Effetti di HIF- α sull'infiammazione

L'infiammazione è una risposta di difesa, ma la sua persistenza si trasforma in patologia. Kiers nel 2016 ha documentato che la stabilizzazione di HIF-1 α è associata a una *downregulation* della concentrazione di proteine deputate alla risposta infiammatoria, ipotizzando un possibile ruolo terapeutico dell'ipossia in pazienti con sepsi ricoverati in terapia intensiva [68]. Gli effetti anti-

infiammatori sarebbero dovuti dall'attivazione della *pathway* dell'adenosina [69]. L'adenosina è un nucleoside ad attività paracrina e autocrina coinvolta non solo nei processi metabolici cellulari, ma anche nella risposta immunitaria, rappresentando un importante meccanismo endogeno di protezione tissutale dall'infiammazione. L'idrolisi dei nucleotidi adeninici (ATP, ADP e AMP) ad adenosina avviene ad opera di due ectoenzimi: ecto-apirasi (CD 39) e la ecto-nucleotidasi (CD-73), la loro espressione è direttamente controllata da HIF-1 α (figura 6a) [70]. Successivi studi confermano il ruolo protettivo della stabilizzazione di HIF-1 α nei confronti del danno da ischemia-riperfusion nella muscolatura scheletrica nei ratti [71]. Li e collaboratori hanno identificato diversi specifici fattori trascrizionali che, interagendo con HIF-2 α , inibiscono l'espressione della CPT1A (carnitina-palmitoiltransferasi), enzima responsabile dell'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi a catena lunga nel fegato e nel rene, il quale enzima secondo gli autori avrebbe un controllo diretto sull'attivazione dell'inflammasoma, a sua volta responsabile dell'attivazione della cascata infiammatoria (figura 6b) [72]. Infine, Hanet al. hanno dimostrato che il Roxadustat ha ridotto in modo significativo il danno polmonare acuto da sepsi in vivo e in vitro su modelli animali, grazie alla stabilizzazione di HIF-1 α . I topi *knockout* per HIF-1 α presentavano un minore tasso di sopravvivenza e aumentata espressione di fattori infiammatori rispetto ai topi che mostravano una *up* regolazione di HIF-1 α [73]. Tuttavia, non c'è un consenso unanime sulla funzione antinfiammatoria dell'HIF- α . Kerber et al. riportano dati che a differenza di quanto citato in precedenza, HIF-1 α e HIF-2 α svolgerebbero ruoli opposti nella risposta antiinfiammatoria sulla colite acuta sperimentale in modelli murini: HIF-1 α potenzia la risposta infiammatoria mentre HIF-2 α la deprime [74]. Yamaguchi et al. forniscono interessanti dettagli molecolari di una possibile interazione bidirezionale tra infiammazione e stabilizzazione di HIF-1 α . Secondo gli autori, l'infiammazione stimolerebbe i macrofagi a rilasciare IL 1 β che induce l'espressione della proteina CEBPD (enhancer-binding protein) nelle cellule tubulari renali attraverso la *pathway* di NF- κ B (NuclearFactor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), in reni ipossici sia acuti che cronici aumentando la trascrizione di HIF-1 α che a sua volta mantiene elevati i livelli di interleuchine pro infiammatorie (figura 6c). Questo studio fornisce le prove che, oltre all'ipossia, ci sarebbero altri fattori in grado di stabilizzare HIF- α [75].

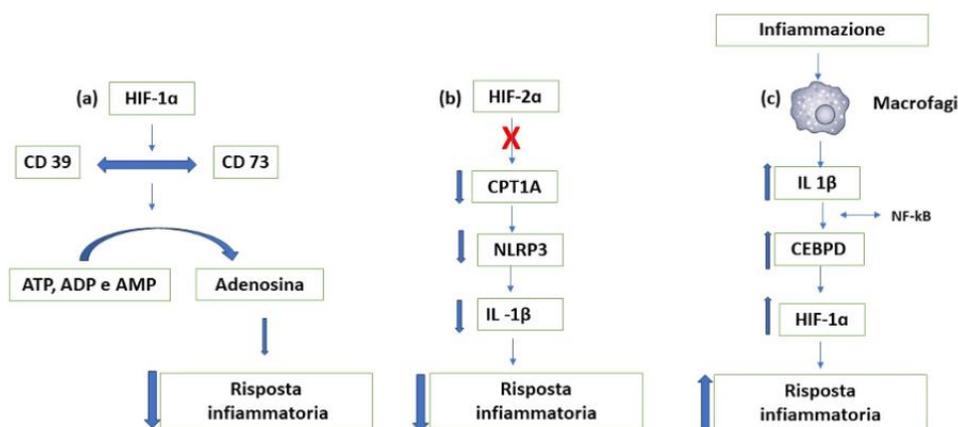


Figura 6. Ruolo dell'isoforma HIF- α sulla risposta infiammatoria. Il pathway dell'adenosina anti-infiammatoria (a) da parte di HIF-1 α che stimola la sintesi degli ectoenzimi ecto-apirasi (CD 39) e ecto-nucleasi (CD73) che convertono i nucleotidi adeninici (ATP, ADP e AMP) in adenosina. Il ruolo anti-infiammatorio di HIF-2 α (b) dovuta alla inibizione l'espressione della CPT1A (carnitina-palmitoil transferasi), enzima responsabile nell'attivazione di NLRP3 (inflammasoma). Interazione bidirezionale tra infiammazione e stabilizzazione da HIF-1 α (c). L'infiammazione stimola i macrofagi a rilasciare IL 1 β che induce l'espressione della proteina CEBPD (enhancer-bindingprotein), attraverso la *pathway* di NF- κ B (NuclearFactor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), nelle cellule tubulari renali, aumentando la trascrizione di HIF-1 α che a sua volta mantiene elevati i livelli di interleuchine pro-infiammatorie.

Conclusioni

I dati disponibili in letteratura forniscono evidenti prove che i benefici della stabilizzazione di HIF- α da parte di Roxadustat vanno oltre la correzione dell'anemia. Tuttavia, bisogna considerare che HIF- α ha come bersaglio molti geni associati ad un'ampia risposta dovuta non solo dalle isoforme di HIF, ma anche dalle differenti linee cellulari considerate. Sono quindi necessari ulteriori studi per monitorare rigorosamente l'entità e la durata dell'attivazione di HIF- α per evitare possibili effetti collaterali inattesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Locatelli F, Fishbane S, Block GA, Macdougall IC. Targeting hypoxia-inducible factors for the treatment of anemia in chronic kidney disease patients. *Am J Nephrol* 45: 187–199, 2017. <https://doi.org/10.1159/000455166>.
2. Kirschner KM, Kelterborn S, Stehr H. Adaptation of the Oxygen Sensing System during Lung Development. *OxidMed Cell Longev*. 2022 Feb18;2022:9714669. <https://doi.org/10.1155/2022/9714669>.
3. Covello KL, Simon MC. HIFs, hypoxia, and vascular development. In: Gerald PS, ed. *Current Topics in Developmental Biology*. Waltham, MA: Academic Press, 2004:37–54. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)62002-3](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(04)62002-3).
4. Beuck, S., Schänzer, W., and Thevis, M. (2012). Hypoxia-inducible factor stabilizers and other small-molecule erythropoiesis-stimulating agents in current and preventive doping analysis. *Drug Test. Anal.* 4 (11), 830–845. <https://doi.org/10.1002/dta.390>.
5. Cioffi, C., Liu, X., Kosinski, P., Garay, M., and Bowen, B. (2003). Differential regulation of HIF-1 alpha prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303 (3), 947–953. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00453-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00453-4).
6. Soniya R, Subhadeep R. Regulation of Transactivation at C-TAD Domain of HIF-1 α by Factor-Inhibiting HIF-1 α (FIH-1): A Potential Target for Therapeutic Intervention in Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2022, Article ID 2407223, 21. <https://doi.org/10.1155/2022/2407223>.
7. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468–472. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>.
8. Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., and Imura, N. (2001). Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α in human kidney: Suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3 α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287 (4), 808–813. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5659>.
9. Fandrey, J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286 (6), R977–R988. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00577.2003>.
10. Schödel J, Ratcliffe PJ. Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. *NatRevNephrol.* 2019;15:641–59. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0182-z>.
11. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468–472. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>.
12. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C et al. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996;271:C1172–C1180. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.4.C1172>.
13. Takeo Narita, Shinsuke Ito, Yoshiki Higashijima. Enhancers are activated by p300/CBP activity-dependent PIC assembly, RNAPII recruitment, and pause release. *Molecular Cell* 81, 2166–2182 May 20, 2021 ^a 2021 Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.03.008>.
14. Webb JD, Coleman ML, Pugh CW. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:3539–3554. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0147-7>.
15. Zuo I, Bin W, Lin I, Tao T. FIH-1-modulated HIF-1 α C-TAD promotes acute kidney injury to chronic kidney disease progression via regulating KLF5 signaling. *Acta Pharmacologica*. Received: 22 October 2020 Accepted: 17 January 2021 Published online: 3 March 2021. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00617-4>.
16. J. Pouyssegur, F. Dayan, and N. M. Mazure, “Hypoxia signaling in cancer and approaches to enforce tumour regression,” *Nature*, vol. 441, no. 7092, pp. 437–443, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04871>.
17. Semenza, G. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148 (3), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>.
18. Appelhoff, R., Tian, Y., Raval, R., Turley, H., Harris, A., Pugh, C., et al. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 279 (37), 38458–38465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406026200>.
19. Haase, V. (2013). Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 27 (1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.003>.
20. Steve E, Dianne T, Zoltan E. Erythropoiesis stimulating agents and reno-protection: a meta-analysis. *BMC Nephrol.* 2017 Jan 11;18(1):14. <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0438-4>.
21. Palazzuoli A, Silverberg DS, Calabrò A, Spinelli T, Quatrini I, Campagna MS, Franci B, Nuti R. Beta-erythropoietin effects on ventricular remodeling, left and right systolic function, pulmonary pressure, and hospitalizations in patients affected with heart failure and anemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009 Jun;53(6):462-7. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181a6ac38>.
22. Wolfgang Jelkmann. Erythropoietin. *Front Horm Res* 2016;47:115-27. <https://doi.org/10.1159/000445174>.

23. De Maria R, Testa U, Luchetti L, Zeuner A, Stassi G, Pelosi E, Riccioni R, Felli N, Samoggia P, Peschle C. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood*. 1999 Feb 1;93(3):796-803.PMID: 9920828.
24. Bussolati B, Lauritano C, Moggio A et al. Renal CD133(1)/CD73(1) progenitors produce erythropoietin under hypoxia and prolyl hydroxylase inhibition. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24:1234–1241. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012080772>.
25. Franke K, Kalucka J, Mamlouk S et al. HIF-1 α is a protective factor in conditional PHD2-deficient mice suffering from severe HIF-2 α -induced excessive erythropoiesis. *Blood* 2013;121:1436–1445. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-449181>.
26. Beall CM. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high altitude natives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: Suppl 1:8655-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701985104>.
27. Z Arany, L E Huang, R Eckner, S Bhattacharya, C Jiang, M A Goldberg, H F Bunn, D M Livingston. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 12;93(23):12969-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.12969>.
28. L E Huang, V Ho, Z Arany, D Krainc, D Galson, D Tendler, D M Livingston, H F Bunn. Erythropoietin gene regulation depends on heme-dependent oxygen sensing and assembly of interacting transcription factors. 1997 Feb;51(2):548-52. <https://doi.org/10.1038/ki.1997.76>.
29. Sandy von S, Martin K, Boris T, Jörg B, Christof D. Gata4 and Sp1 regulate expression of the erythropoietin receptor in cardiomyocytes. *J Cell Mol Med* 2011 Sep;15(9):1963-72. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01193.x>.
30. Chin K, Oda N, Shen K, et al. Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor gene by proteins binding to GATA-1 and Sp1 motifs. *Nucleic Acids Res*. 1995; 23: 3041–9. <https://doi.org/10.1093/nar/23.15.3041>.
31. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev*. 2013; 27:41–53. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.003>.
32. Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*. 2008; 111:5223–5232. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-115857>.
33. Koury MJ, Haase VH. Anaemia in kidney disease: harnessing hypoxia responses for therapy. *Nat Rev Nephrol*. 2015; 11:394–410. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.82>.
34. Neil S, Volker H. Hypoxia-Inducible Factor Activators in Renal Anemia: Current Clinical Experience. *Adv Chronic Kidney Dis* 2019 Jul;26(4):253-266. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2019.04.004>.
35. Volker H. HIF-1. HIF-prolyl hydroxylases as therapeutic targets in erythropoiesis and iron metabolism. *Hemodial Int*. 2017 June; 21(Suppl 1): S110–S124. <https://doi.org/10.1111/hdi.12567>.
36. Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2 α expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol*. 2007; 14:420–426. <https://doi.org/10.1038/nsmb1222>.
37. Mastrogiannaki M, Matak P, Delga S, Deschemin JC, Vaulont S, Peyssonnaud C. Deletion of HIF-2 α in the enterocytes decreases the severity of tissue iron loading in hepcidin knockout mice. *Blood*. 2011; 119:587–590. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-380337>.
38. Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem*. 1997; 272:20055–20062. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.20055>.
39. Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem*. 2000; 275:21048–21054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000636200>.
40. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem*. 1997; 272:5375–5381.
41. Taylor M, Qu A, Anderson ER, et al. Hypoxia-inducible factor-2 α mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology*. 2011; 140:2044–2055. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.03.007>.
42. Ganz T. Molecular control of iron transport. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18:394–400. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006070802>.
43. Zaritsky J, Young B, Wang HJ, et al. Hepcidin—a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009; 4:1051–1056. <https://doi.org/10.2215/CJN.05931108>.
44. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002; 110:1037–1044. <https://doi.org/10.1172/JCI15686>.
45. Coffey R, Ganz T. Erythroferrone: An erythroid regulator of hepcidin and iron metabolism. *HemaSphere* 2: e35, 2018. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000035>.
46. Liu Q, Davidoff O, Niss K, Haase VH. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *J Clin*

- Invest. 2012; 122:4635–4644.
<https://doi.org/10.1172/JCI63924>.
47. Gordeuk VR, Miasnikova GY, Sergueeva AI, et al. Chuvash polycythemia VHRLR200W mutation is associated with down-regulation of hepcidin expression. *Blood*. 2011; 118:5278–5282.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-345512>.
 48. Schonewille M, de Boer JF, Mele L, Wolters H, Bloks VW, Wolters JC, et al. Statins increase hepatic cholesterol synthesis and stimulate fecal cholesterol elimination in mice. *J Lipid Res* 2016;57(8):1455e64.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M067488>.
 49. Summons, R. E., Bradley, A. S., Jahnke, L. L., and Waldbauer, J. R. Steroids, triterpenoids and molecular oxygen. *Philos. Trans. R. Soc. LondB. Biol. Sci.* 361, 951–968.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1837>.
 50. Nguyen AD, McDonald JG, Bruick RK, DeBose-Boyd RA. Hypoxia stimulates degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase through accumulation of lanosterol and hypoxia-inducible factor-mediated induction of insigs. *J Biol Chem* 2007;282(37):27436e46.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M704976200>.
 51. Seonghwan H, Andrew DN, Youngah J, Luke JE, James B, and Russell A. Hypoxia-inducible factor 1 activates insulin-induced gene 2 (Insig-2) transcription for degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase in the liver *J Biol Chem* 2017 Jun 2;292(22):9382-9393.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788562>.
 52. Wen-Jun Salman A, Fredric BK. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux *Annu Rev Physiol* 2018 Feb 10;80:95-116. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121550>.
 53. Keiji H, Shohei K, Saori M, Katsunori Y, Momoko H, Taisuke K. Effects of roxadustat on anemia, iron metabolism, and lipid metabolism in patients with non-dialysis chronic kidney disease. *Front Med (Lausanne)*. 2023 Feb 22;10:1071342.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1071342>.
 54. Maria K, Georgia I, Nikolaos N, Maria A, Ulf L, Symeon S, Zoi L, George S, Ilias M. CK1δ restrains lipin-1 induction, lipid droplet formation and cell proliferation under hypoxia by reducing HIF-1α/ARNT complex formation. *Cell Signal* 2015 Jun;27(6):1129-40.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.02.017>.
 55. Jung-whan K, Irina T, Gregg LS, Chi V Dang. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia *CellMetab* 2006 Mar;3(3):177-85.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>.
 56. Wang Z, Yang X, Kai J, Wang F, Wang Z, Shao J, Tan S, Chen A, Zhang F, Wang S, Zhang Z, Zheng S. HIF-1α-upregulated lncRNA-H19 regulates lipid droplet metabolism through the AMPKα pathway in hepatic stellate cells. *Life Sci* 2020 Aug 15;255:117818.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117818>.
 57. Hardman D, McFalls D, Fakas S. Characterization of phosphatidic acid phosphatase activity in the oleaginous yeast *Yarrowialipolytica* and its role in lipid biosynthesis *Yeast* 2017 Feb;34(2):83-91.
<https://doi.org/10.1002/yea.3216>.
 58. Lauren SC, Jennifer RD, Loren GF, Peter T, Stephen G Y, Karen R. Lipins, lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling *Prog Lipid Res* 2013 Jul;52(3): 305-16.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.04.001>.
 59. Neuschwander-Tetri. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies *Nat Med* 2018 Jul;24(7):908-922.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>.
 60. Xiaoyu Z, Lili J, Xuejiao W, Mengtuan L and Yujun D. Roxadustat: Not just for anemia *Frontiers in Pharmacology* 29 August 2022.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.971795>.
 61. Kapitsinou, P., Jaffe, J., Michael, M., Swan, C., Duffy, K., Erickson-Miller, C., et al. (2012). Preischemic targeting of HIF prolyl hydroxylation inhibits fibrosis associated with acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 302 (9), 1172–1179.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00667.2011>.
 62. Li, X., Zou, Y., Xing, J., Fu, Y. Y., Wang, K. Y., Wan, P. Z., et al. Pretreatment with roxadustat (FG-4592) attenuates folic acid-induced kidney injury through antiapoptosis via akt/GSK-3/nrf2 pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020, 6286984. <https://doi.org/10.1155/2020/6286984>.
 63. H. F. Zhang, J. H. Wang, Y. L. Wang et al., “Salvianolic acid a protects the kidney against oxidative stress by activating the Akt/GSK-3β/Nrf2 signaling pathway and inhibiting the NF-κB signaling pathway in 5/6 nephrectomized rats,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, Article ID 2853534, 16 pages, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/2853534>.
 64. M. Nezu, N. Suzuki, and M. Yamamoto, “Targeting the KEAP1-NRF2 system to prevent kidney disease progression.” *American Journal of Nephrology*, vol. 45, no. 6, pp. 473–483, 2017. <https://doi.org/10.1159/000475890>.
 65. Ji, L. Wang, S. He et al., “Effects of acute hypoxia exposure with different durations on activation of Nrf2-ARE pathway in mouse skeletal muscle,” *PLoS One*, vol. 13, no. 12, article e0208474, 2018.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208474>.
 66. Elizabeth Tarasewicz and Jacqueline S. Jeruss. Phospho-specific Smad3 signaling Impact on breast oncogenesis. *Cell Cycle* 11:13, 2443-2451; July 1, 2012; © 2012 Landes Bioscience <https://doi.org/10.4161/cc.20546>.
 67. Hui D, Jinjun C, Jingping Q, Ruhua C. TGF-β-induced α-SMA expression is mediated by C/EBPβ acetylation in human alveolar

- epithelial cells. *Mol Med* (2021) 27:22
<https://doi.org/10.1186/s10020-021-00283-6>
68. Kiers H, Scheffer G, van der Hoeven J, Eltzschig H, Pickkers P, and Kox M. Immunologic consequences of hypoxia during critical illness. *Anesthesiology* 125 (1), 237–249. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001163>
69. Kong T, Westerman KA, Faigle M, Eltzschig HK, Colgan SP. HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB J*. 2006;20:2242–50. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6419com>.
70. Warner DS, Warner MA, Eltzschig HK, Ph D. Adenosine: An Old Drug Newly Discovered. *Anesthesiology*. 2009;111:904–15. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181b060f2>.
71. Cheng, W., Liu, X., Zhang, L., Guo, X., Wang, F., Zhang, Y., et al. (2019). Chronic intermittent hypobaric hypoxia attenuates skeletal muscle ischemia-reperfusion injury in mice. *Life Sci*. 231, 116533. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.06.008>
72. Xiaopeng Li, Xiujuan Zhang, Jialin Xia, Linqi Zhang. Macrophage HIF-2 α suppresses NLRP3 inflammasome activation and alleviates insulin resistance. *Cell Rep* 2021 Aug 24;36(8):109607. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109607>.
73. Han, F., Wu, G., Han, S., Li, Z., Jia, Y., Bai, L., et al. (2020). Hypoxia-inducible factor prolyl-hydroxylase inhibitor roxadustat (FG-4592) alleviates sepsis-induced acute lung injury. *Respir. Physiol. Neurobiol*. 281, 103506. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103506>.
74. Kerber, E., Padberg, C., Koll, N., Schuetzhold, V., Fandrey, J., and Winning, S. The importance of hypoxia-inducible factors (HIF-1 and HIF-2) for the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Sci*. 21 (22), E8551. <https://doi.org/10.3390/ijms21228551>.
75. Yamaguchi, J., Tanaka, T., Eto, N., and Nangaku, M. (2015). Inflammation and hypoxia linked to renal injury by CCAAT/enhancer-binding protein δ . *Kidney Int*. 88 (2), 262–275. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.21>.