

DALL'OSSIGENO ALL'EPO, PROTAGONISTA DELL'ASSE CUTE-CERVELLO-RENE

Michele Buemi, Valentina Donato, Rosaria Lupica, Valeria Cernaro, Silvia Lucisano, Antoine Buemi, Eleonora Crascì, Antonio Lacquaniti

Cattedra di Nefrologia, Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi, Messina

From oxygen to erythropoietin, as a protagonist of the skin-brain-kidney axis

Erythropoietin synthesis is one of the essential adaptive responses to a hypoxic environment. In mammals, a renal oxygen sensor capable of stimulating erythropoietic hormone synthesis through a transcriptional factor called HIF (hypoxia-inducible factor) has long been identified. Recent research has demonstrated that cerebral astrocytes and skin keratocytes can also produce erythropoietin as a response to different oxygen concentrations. Therefore, it is possible to hypothesize a skin-brain-kidney link which, through erythropoietin production, modulates the oxygen contribution to tissues. Moreover, the results are not so unambiguous and further research on the pleiotropic effects of erythropoietin would be opportune.

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Erythropoietin,
Brain, Skin,
Oxygen

PAROLE CHIAVE:

EPO,
Cervello,
Cute,
Ossigeno

✉ Indirizzo degli Autori:

Prof. Michele Buemi
Via Salita Contino 30
98124 Messina
e-mail: buemim@unime.it

SENSORI DELL'OSSIGENO

L'ossigeno gioca un ruolo chiave nel metabolismo di molti esseri viventi, dai semplici organismi unicellulari procarioti sino a quelli complessi multicellulari, incluso il corpo umano (1) (Fig. 1).

Alterazioni della sua disponibilità, causate da variazioni nell'equilibrio tra l'introduzione ed il consumo, richiedono un'adeguata risposta adattativa. Questi meccanismi possono essere attivati sia dalle prime fasi embrionali sia in vari momenti dello sviluppo, per esempio durante le improvvise modifiche nell'introduzione dell'ossigeno alla nascita o in situazioni di stress.

Negli organismi più complessi, le risposte adattative avvengono in modi diversi e coinvolgono il comportamento, il sistema nervoso, la patofisiologia, la biochimica e la regolazione genica. L'inadeguata regolazione di queste risposte contribuisce alla generazione di numerose malattie come la retinopatia, il cancro, i disturbi cerebrovascolari e cardiaci. L'ipossia può stimolare l'espressione dell'eritropoietina (EPO), una glicoproteina sintetizzata prevalentemente dal rene che attraverso il sangue raggiunge il midollo osseo, dove stimola il precursore dei globuli rossi che prolifera e si differenzia in eritrociti; in tal modo incrementa il

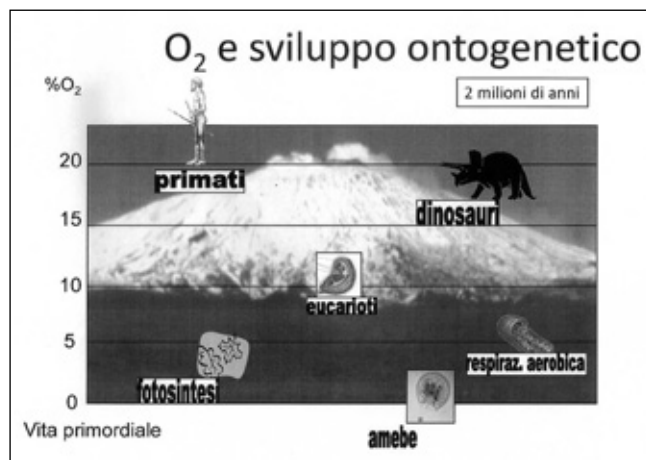


Fig. 1 - La concentrazione dell'ossigeno ha influito sullo sviluppo degli esseri viventi sulla terra.

numero di eritrociti e il potenziale introito di ossigeno nel sangue. In uno studio sul *promoter* dell'EPO, la sequenza sensibile all'ipossia è stata identificata nel gene 5'-TACGTGCT-3' ed è stata chiamata: HRE (*Hypoxia Response Element*). Questa sequenza, in condizioni di ipossia, fissa il fattore trascrizionale HIF (*Hypoxia-inducibile factor*) (2).

La scoperta dell'attività dell'HIF ha portato alla clonazione di due forme complementari di DNA coinvolte in questa attività (3), che codificano per le proteine del complesso HIF: HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-1 β . HIF-1 β è stato identificato come il fattore "Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator" (ARNT1), una proteina già descritta e nota per essere coinvolta in alcune attività metaboliche della cellula.

Dall'altro lato, HIF-1 α , di cui tre isoforme sono state identificate nell'uomo, è specifico per la risposta all'ossigeno. Il gene che codifica per HIF-1 α e HIF-2 α , localizzato sul cromosoma 14, è formato da 15 esoni nell'uomo, mentre il gene di HIF-1 β è localizzato sul cromosoma 1. I prodotti di trascrizione di HIF-1 α e HIF-2 α nell'uomo, sono espressi in differenti organi (4).

Wiesener et al. (5), hanno dimostrato che nei ratti esiste una differenza significativa tra le espressioni delle due isoforme di HIF-1 α e 2 α : HIF-1 α è espresso in condizioni basali di normossia, diversamente da HIF-2 α , e l'induzione di HIF-1 α nel rene e nel fegato è solo transitoria, terminando dopo tre ore; l'espressione di HIF-2 α viene mantenuta sino a sei ore in tutti gli organi studiati. In fine, nel fegato e nel rene è richiesta ipossia severa (6% O₂) per indurre HIF-1 α piuttosto che HIF-2 α , mentre il polmone differisce da tutti gli altri organi perché può indurre HIF-2 α , mentre non vi è evidenza di HIF-1 α nemmeno con il 6% di ossigeno ambientale.

Gli epatociti, i cardiomiociti e le cellule endoteliali miocardiche, rispondono alla condizione ipossica con la modulazione di HIF-1 α e HIF-2 α , mentre nel rene e nell'encefalo le due isoforme possono essere espresse da differenti tipi cellulari. In entrambi gli organi HIF-2 α è confinato nelle cellule non parenchimali, mentre HIF-1 α è espresso dalle cellule tubulari renali e da quelle neuronali.

COME VIENE PERCEPITO L'OSSIGENO?

La natura molecolare dei sensori dell'ossigeno che coinvolge la risposta HIF-1 α non è ben conosciuta. Diversi anni fa Goldberg (6) ha proposto un modello che coinvolgeva un'emoproteina. La presenza di ossigeno modificherebbe la conformazione di un'emoproteina, bloccando il flusso di elettroni o creando un accettore competitivo capace di influenzare il flusso di elettroni destinati al segnale molecolare. Jaakkola et al. (7) hanno pubblicato dei dati sul meccanismo di attivazione di HIF, suggerendo la presenza di una attività idrossilasica che dipende dal ferro e dalla disponibilità di ossigeno. L'enzima corrispondente, HIF-PH (HIF α proliil-idrossilasi), è probabilmente il sensore dell'ossigeno cellulare. Sono state proposte altre ipotesi fondate sul coinvolgimento enzimatico che comporta la formazione di radicali dell'os-

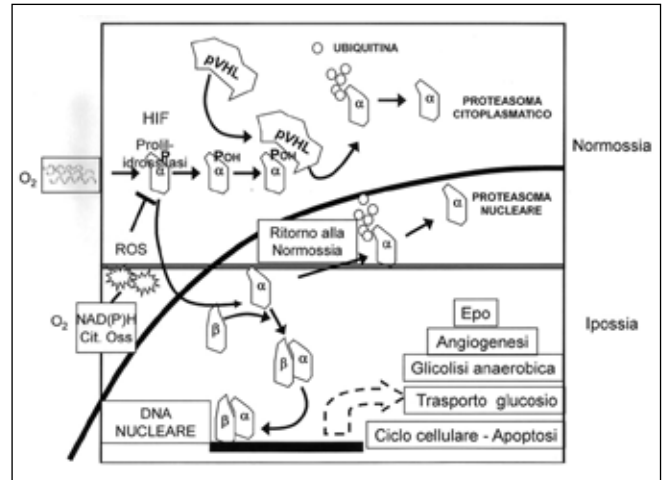


Fig. 2 - L'ossigeno regola l'attività della proteina HIF-1 α . In condizione di normossia la proteina HIF-1 α è piuttosto instabile e viene rapidamente degradata (in 5 minuti) dai proteosomi. Quando la proliil-idrossilasi è inattiva la proteina HIF-1 α viene invece velocemente stabilizzata e migra nel nucleo dove lega la proteina HIF-1 β . L'attivazione di HIF-1 β , stimolata dall'ipossia, provoca la sintesi di fattori proteici coinvolti nella eritropoiesi, angiogenesi e glicolisi anaerobica.

sigeno (reactive oxygen species, ROS).

In presenza di ossigeno la proteina HIF-1 α è altamente instabile. I residui della proliil-idrossilasi, cioè innesca l'interazione tra HIF e la parte β di pVHL (proteina di Von Hippel-Lindau). Insieme con la elongina B e C e la cullina-2, questa proteina forma un complesso che presenta una attività legante le ubiquitine. La fase di "Ubiquitinazione" preclude la degradazione di HIF-1 α da parte dei proteosomi.

In condizioni di ipossia questo processo è interrotto perché l'azione della proliil-idrossilasi è limitata dalla carenza di ossigeno. HIF-1 α è così stabilizzato e può essere trasferito dentro il nucleo e formare un complesso trascrizionale attivo: HIF-1 β e CBP/p300 (cAMP response element binding protein), che a sua volta può indurre la trascrizione dei geni sensibili all'ipossia come l'EPO (Fig. 2).

Nell'uomo le trascrizioni di HIF-1 α sono fortemente espresse in tutti gli organi in maniera costitutiva. Questa espressione ubiquitaria è stata confermata nel topo, nel ratto e nei pesci a conferma del significato ontogenetico che tale complesso sistema occupa nello sviluppo degli esseri viventi (8).

Altri sensori (ossido reductasi e citocromi) possono partecipare al processo attraverso la via dei ROS. HIF attiva non solo l'EPO ma anche geni di differenti molecole inclusi nel meccanismo di risposta all'ipossia: regolazione del tono vasale (NO sintetasi), angiogenesi (VEGF, PDGF), glicolisi anaerobica e introito cellulare di glucosio. Al ritorno delle condizioni di normossia HIF-1 α viene rapidamente degradato da un proteosoma nucleare (9).

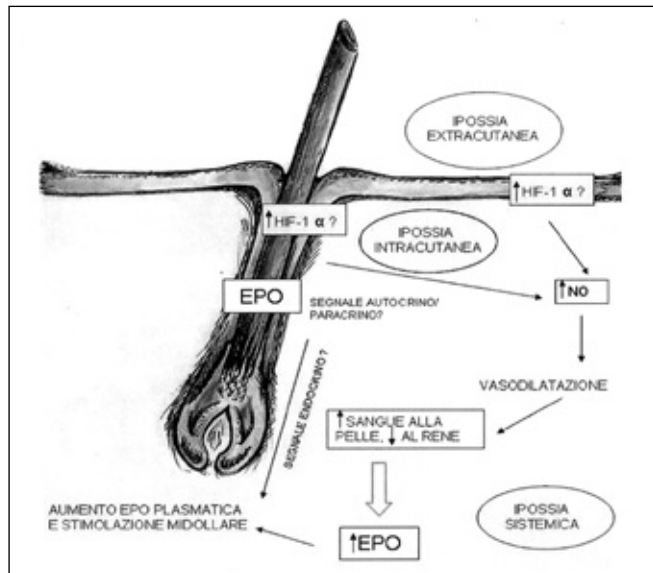


Fig. 3 - La produzione autocrina e paracrina di EPO cutanea è in grado di modificare il flusso sanguigno renale.

Fino a poco tempo fa si riteneva che la produzione di EPO fosse di esclusiva pertinenza renale ed epatica, solo recentemente è stato messo in evidenza che numerosi tessuti come il cuore e il polmone sono in grado di produrre l'ormone così come è stato dimostrato nei teleostei (10).

Anche nei mammiferi, Paus et al. (11) hanno individuato nella cute un complesso meccanismo sensoriale per l'ossigeno finalizzato al controllo della secrezione dell'EPO renale ed alla sua produzione locale autocrina e paracrina. Sembra essere il bulbo pilifero la struttura cutanea centrale di questo sorprendente meccanismo che apre un nuovo scenario sull'azione pleiotropica e protettiva dell'EPO nei confronti di tessuti sottoposti ad ischemia, intervenendo inoltre sulla funzione dei melanociti della cute (12) (Fig. 3).

La cute sembra comportarsi come un organo sensibile all'ipossia: in effetti, i cheratinociti fissano il nitroimidazolo F5, un marcatore specifico delle zone ipossiche, ed esprimono alti livelli di trascritti HIF-1 (13).

Per studiare meglio questo fenomeno, gli Autori hanno costruito un ratto mutato, $K14cre+HIF-1^{+/+}$, che si caratterizza per una inibizione specifica dell'espressione di HIF-1 nei cheratinociti (l'espressione di cre è controllata dal promotore della cheratina 14), ciò non compromette la sopravvivenza degli animali e non modifica i parametri ematologici in condizione di normo-ossigenazione basale (20% di O_2). Invece, la risposta dei ratti mutati all'atmosfera ipossica (9% O_2) è patologica: l'EPO plasmatica aumenta di 30 volte nei controlli e solo del 30% nei ratti mutati, questo si associa ad un difetto di risposta trascrizionale del

gene EPO nel rene, sottolineando un legame tra la reazione cutanea all'ipossia e la produzione renale di EPO. Tale difetto non si rileva nei ratti mutati $K14cre+/HIF-2^{+/+}$ che si comportano in maniera fisiologica suggerendo dunque un ruolo determinante dell'HIF-1 α nella induzione di EPO a livello dell'epidermide. Inoltre i ratti mutati sprovvisti dell'espressione di VHL (proteina di Von Hippel-Lindau) nell'epidermide ($K14cre+/VHL^{+/+}$), proteina che stabilizza l'espressione di HIF-1 α e 2 α , presentano un ematocrito elevato e livelli elevati di reticulociti ed EPO. Questa sovraespressione di EPO è prevalentemente epatica e non renale. Gli Autori hanno ripetuto questi esperimenti in un modello di deplezione condizionale di VHL nell'adulto, eliminando l'eventuale influenza della carenza di VHL e della sovraespressione di HIF-1/2 nella pelle nel corso dello sviluppo. L'impiego di doppie e triple mutazioni attraverso l'incrocio di topi *knockout* condizionali HIF-1^{+/+} e o HIF-2^{+/+} con gli animali nei quali VHL è inattivato nei cheratinociti ha permesso di dimostrare l'azione fondamentale dell'HIF-2 nel fenotipo del mutante $K14cre-VHL$. Infatti, la sua invalidazione ristabilisce livelli normali di EPO, mentre la delezione epidermica di HIF-1 in questi ratti mutati $K14creVHL^{+/+}$ non è sufficiente per controbilanciare questo ultimo effetto (14).

Questa osservazione mette in evidenza un ruolo differenziale delle due sottounità HIF-1 α e HIF-2 α a secondo che VHL funzioni oppure no.

IL NITROSSIDO E L'HIF

Dati convincenti dimostrano che il flusso sanguigno è il segnale che scatena la risposta ipossica nel rene e nel fegato. Nei ratti mutati, $K14creVHL^{+/+}$, il flusso sanguigno è deviato verso l'epidermide a scapito del rene e del fegato. Il risultato è una diminuzione della pressione sanguigna e l'ipossia in questi organi. L'ossido nitrico (NO), il maggiore regolatore vaso-dilatante del tono vascolare, è elevato nei mutanti. In effetti, iNOS (*inducible oxide nitric synthase*) è un gene bersaglio della risposta trascrizionale di HIF all'ipossia. È dunque legittimo analizzare l'implicazione della via NO/iNOS in questa deviazione di flusso verso la cute. Gli Autori hanno verificato in topi normali una osservazione fatta nei ratti: l'inibizione di NO tramite L-NAME (*N-nitro-L arginine methyl ester*) in un animale di controllo induce un aumento sistemico della produzione di EPO (20%). Nei ratti mutati $K14creVHL^{+/+}$ la somministrazione di L-NAME fa diminuire la vasodilatazione cutanea ed anche i livelli di EPO sistemici che statisticamente non differiscono da quelli rilevati negli animali di controllo. Il segnale NO è dunque un intermediario essenziale per il quale la modifica di HIF a livello cutaneo modula la stimolazione della

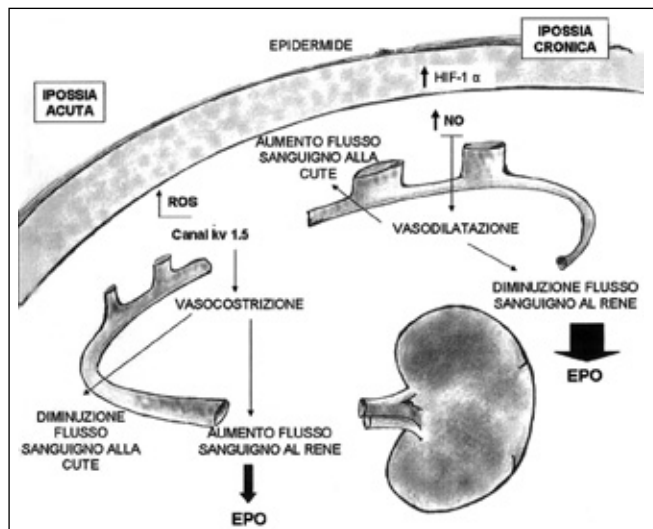


Fig. 4 - L'ipossia acuta induce vasocostrizione cutanea tramite il canale del potassio Kv1.5, con incremento del flusso renale e moderata produzione di EPO. L'ipossia cronica, invece, induce l'attivazione del fattore HIF-1 che direttamente e tramite il nitrossido modula il flusso tissutale renale con significativo incremento della secrezione di EPO.

sintesi di EPO. L'implicazione di questa via è confermata dall'azione di un donatore di NO (nitroglicerina) che se somministrato per via generale è senza effetti; questo farmaco induce una significativa sintesi renale di EPO, di ben 7 volte, se è somministrato tramite un cerotto cutaneo. Esiste dunque una regolazione molto specifica del flusso sanguigno nell'epidermide che può modificare il flusso dai territori splanchnici verso la cute, inducendo un segnale ipossico nei tessuti che sono i principali produttori di EPO, come il rene.

L'EPO E LA CUTE

L'EPO interviene soprattutto nell'adattamento all'ipossia cronica, ed è da domandarsi quale sia il ruolo della cute in caso di ipossia acuta. In questa situazione la risposta cardiorespiratoria predomina, ed attraverso la vasocostrizione polmonare indipendentemente dall'HIF, modula immediatamente il flusso sanguigno verso il cervello e il fegato (15) (Fig. 4).

Per testare il ruolo della cute topi normali sono stati posti in maniera che la concentrazione di ossigeno sia differente a livello del capo (aria respirata) e del corpo (che riflette l'ossigenazione della cute). Se l'aria inspirata è ipossica (10% O₂) il topo è esposto completamente all'atmosfera ipossica (10% O₂) si osserva in circa 5 ore un incremento importante dei livelli di EPO e dei trascritti EPO renali; invece l'EPO è più che raddoppiata se la cute è esposta a condizioni di normo-ossigenazione (21% O₂). Que-

sta variazione dei livelli di EPO modificando l'ossigenazione cutanea è abolita nei mutanti K14creHIF-1 $\alpha^{+/+}$, confermando l'intervento di HIF-1. Se si misura dopo un'ora direttamente la risposta vascolare immediata nei topi con ipossia respiratoria, si constata che un'ipossia cutanea induce vasocostrizione, ma se il resto del corpo si trova in condizioni di normossia si attiva una derivazione massiva (x10) del flusso verso la cute diminuendo il flusso renale ed epatico e stimolando la risposta ipossica sistemica. Questa risposta immediata farebbe intervenire lo stesso canale del potassio Kv1.5 che controlla la vasocostrizione polmonare e conferma la tesi secondo cui la cute interviene anche nella regolazione della risposta del tono vascolare all'ipossia acuta (16).

EPO ED ENCEFALO

Il coinvolgimento delle molecole di EPO nel mantenimento dell'omeostasi del sistema nervoso è stato spesso oggetto di interesse.

Recenti studi hanno dimostrato che ci sono dei forti legami tra EPO e cervello. Infatti, a parte il rene che rimane il principale sito di produzione dell'EPO nell'età adulta, neuroni e astrociti possono secernere EPO ed entrambi hanno recettori specifici (17).

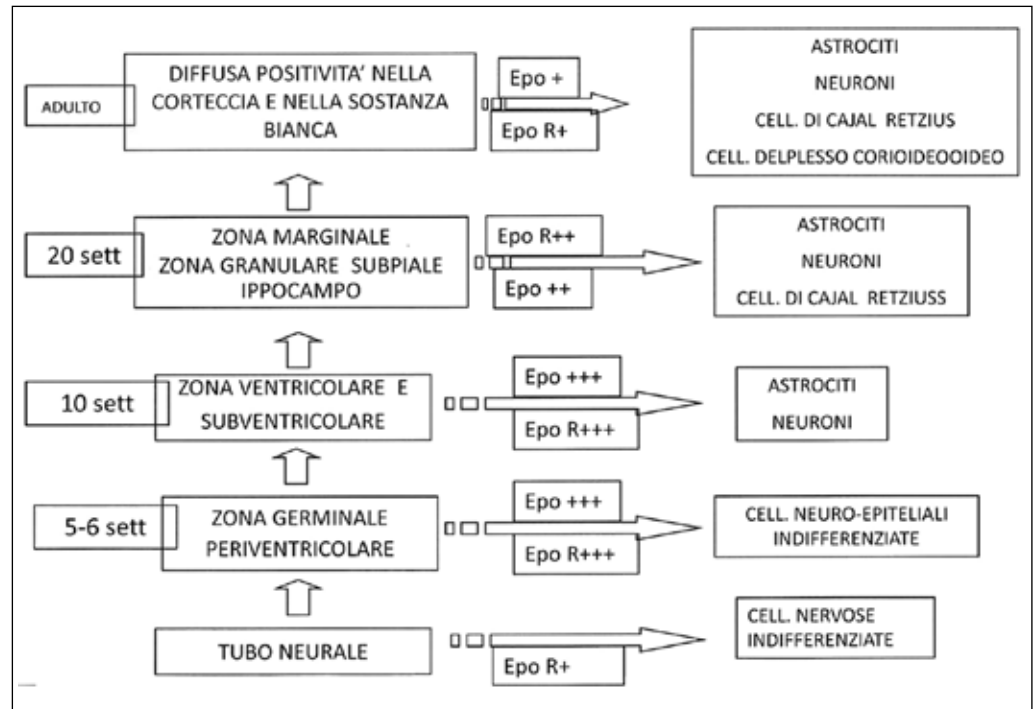
L'mRNA dell'EPO è stato identificato in biopsie della corteccia temporale, nell'ippocampo ed amigdala (18). Nelle scimmie i livelli di mRNA aumentano dopo esposizione a bassi livelli di ossigeno, come succede nell'encefalo dopo induzione dell'anemia. Inoltre, due tipi di recettori per EPO sono stati identificati nell'endotelio dei capillari cerebrali (19). Questi recettori, insieme all'EPO, appaiono nel cervello alla quinta settimana dopo il concepimento e la loro distribuzione cambia durante le fasi dello sviluppo (Fig. 5).

Di conseguenza l'EPO gioca un ruolo importante nello sviluppo del cervello e nel mantenimento dell'omeostasi cerebrale con un'azione paracrina ed autocrina. Induce inoltre la neurogenesi durante il primo sviluppo e agisce come un fattore neurotropico durante il resto dell'accrescimento.

Recentemente Weidemann et al. (20) hanno dimostrato che l'EPO di origine astrocitaria ha anche un ruolo significativo nella regolazione dell'eritropoiesi tramite l'HIF.

I tre geni HIF-1 α , HIF-2 β e VHL sono inattivati selettivamente negli astrociti tramite *cre-lox* e l'espressione della recombinasi è sotto il controllo del promotore GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) specifico della linea astrocitaria. Gli animali transgenici ricombinanti sono vitali alla nascita ed a seguito dell'inattivazione di HIF-1 o HIF-2 negli astrociti non si hanno conseguenze patologiche, mentre l'inattiva-

Fig. 5 - Recettori dell'EPO e secrezione di EPO durante lo sviluppo del cervello.



zione di VHL (GFAPcre+VHL^{+/+}) influenza la crescita dell'animale e riduce la durata della vita. Si constata in particolare un deficit neurologico, turbe di locomozione e idrocefalo a testimonianza dell'alterata permeabilità della barriera ematoencefalica, e sorprendentemente il notevole aumento dell'ematocrito (circa 80% in 5 settimane), dei reticolociti e dei valori plasmatici di EPO di ben 5 volte. Nei ratti mutati GFAPcre+VHL^{+/+} i trascritti "astrocitari" di EPO sono 2000 volte maggiori rispetto agli "astrociti di controllo". La secrezione renale di EPO è ridotta, a testimonianza di un retro-controllo negativo funzionale che conferma la responsabilità dell'EPO astrocitaria nelle alterazioni sistemiche osservate. Curiosamente la sintesi epatica di EPO persiste. L'incrocio di questi topi con animali *knockout* per il gene HIF-1 α ha permesso di incriminare l'HIF-2 la cui delezione è in grado di rinormalizzare l'ematocrito e la sopravvivenza nei topi GFAPcre+VHL^{+/+}, mentre la delezione di HIF-1, aggrava il fenotipo.

La delezione di VHL oltre ad indurre la produzione di EPO, stimola anche la produzione di VEGF (*vascular endothelial growth factor*) che è un bersaglio della proteina di *Von Hippel-Lindau* (21).

Tuttavia, la delezione di VEGF è in grado di ridurre le conseguenze non ematologiche del fenotipo mutante GFAPcre+VHL^{+/+}, mentre non corregge le alterazioni ematologiche.

La concentrazione plasmatica di EPO astrocita-

ria aumenta rapidamente nei topi normali esposti ad una atmosfera ipossica, e la delezione di HIF-2 negli astrociti minimizza questa risposta che è completamente abolita nei ratti mutati sia per HIF-1 che per HIF-2. In assenza di HIF-2 astrocitario l'EPO plasmatica resta bassa nelle prime ore, indicando che né il rene né il fegato sono in grado di compensare questa diminuzione di EPO astrocitaria. Logicamente l'aumento del numero di eritroblasti midollari e dunque di reticolociti è ai minimi termini nei topi GFAPcre+HIF-2^{+/+}. Identiche alterazioni sono osservate negli animali GFAPcre+HIF^{+/+} dopo emorragia, altro potente stimolo della sintesi di EPO renale. Nelle due condizioni patologiche, i meccanismi di compensazione intervengono dopo 72 ore. La normalizzazione tardiva dei parametri suggerisce che l'EPO cerebrale è implicata nella risposta acuta all'ipossia e che essa precede la risposta renale, come un guardiano che preserva l'ossigenazione del cervello in condizioni critiche. Sembra dunque che il ruolo dell'EPO del cervello sia meno ermetico di quanto non si pensi e che essa subisca alla regolazione sistemica della risposta all'ipossia. Bisogna ammettere che l'ormone attraversa la barriera emato-encefalica. Resta da capire perché la risposta renale intervenga tardivamente rispetto alla risposta astrocitaria in questo modello sperimentale (22).

CONCLUSIONE

Queste interessanti ricerche dimostrano che l'EPO, oltre a stimolare la produzione dei globuli rossi, presenta numerose azioni pleiotropiche cioè può agire su diversi tipi di cellule attraverso vari meccanismi, svolgendo funzioni che vanno al di là del ruolo che le viene classicamente attribuito. Contribuisce, infatti, alla modulazione della risposta infiammatoria e immunitaria stimolando la funzione fagocitica dei leucociti polimorfonucleati riducendo l'attivazione dei macrofagi. Possiede effetti diretti emodinamici e vasoattivi che non dipendono esclusivamente dall'incremento dell'ematocrito e della viscosità ematica. Numerosi studi consentono di affermare che l'EPO, a diverse concentrazioni, esercita un'azione protettiva principalmente a livello del sistema nervoso centrale, del sistema vascolare e del tessuto renale, attraverso una delle poche attività rigenerative naturali dell'uomo: l'angiogenesi. Questo meccanismo, che coinvolge le cellule staminali endoteliali e il VEGF, è stato sperimentalmente dimostrato con l'EPO umana ricombinante (rHuEPO). La scoperta inoltre di una produzione cardiaca di EPO nel *Fugu rubripes* e nello *Zebrafish* ha portato i cardiologi a "scoprire" l'EPO, postulando per questo ormone un possibile ruolo nel trattamento della patologia cardiovascolare. Queste sono alcune delle evidenze sperimentali che dimostrano come l'EPO possa essere considerata a ragione un importante elemento di studio della medicina rigenerativa ed inserita nel *network* di farmaci capaci di rigenerare tessuti ed organi (23).

Tuttavia, recentemente questi dati sono stati analizzati da Sinclair et al. (24) e da Swift et al. (25), che rilevano, nelle loro ricerche, bassi livelli di recettori per l'EPO nei tessuti non eritropoietici mettendo in dubbio

il ruolo pleiotropico dell'ormone.

Queste ricerche, chiaramente esprimono un conflitto di interesse con multinazionali che producono farmaci stimolanti l'eritropoiesi, i quali hanno tra l'altro una importante implicazione circa l'uso dell'EPO ricombinante umana nei pazienti anemici affetti da malattia tumorale.

Forse il recettore tissutale dell'EPO è difficilmente misurabile per mancanza di anticorpi adatti? (26).

○ Dovremmo tornare indietro per rivedere la storia della fisiopatologia dell'EPO?

La ricerca continua.

RIASSUNTO

La sintesi dell'EPO è una delle risposte adattative essenziali all'ambiente ipossico. Nei mammiferi è stato da tempo individuato un sensore renale per l'ossigeno capace di stimolare la sintesi dell'ormone eritropoietico attraverso un fattore di trascrizione HIF (hypoxia inducibile factor). Recenti ricerche hanno dimostrato che anche gli astrociti cerebrali e i cheratociti della cute sono in grado di produrre EPO come risposta a diverse concentrazioni di ossigeno. È possibile dunque ipotizzare un legame tra cute, cervello e rene che attraverso la produzione di EPO modula l'apporto di ossigeno ai tessuti. Tuttavia i dati non sono così univoci ed una riflessione sugli effetti pleiotropici dell'EPO stimola ulteriori ricerche.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 1996; 76 (3): 839-85.
2. Semenza GL, Neefelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88 (13): 5680-4.
3. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270 (3): 1230-7.
4. Stolze I, Berchner-Pfannschmidt U, Freitag P, et al. Hypoxia-inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells. *Blood* 2002; 100 (7): 2623-8.
5. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003; 17 (2): 271-3.
6. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988; 242 (4884): 1412-5.
7. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292 (5516): 468-72.
8. Semenza GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiological and pathological erythropoiesis. *Blood* 2009; 114 (10): 2015-9.
9. Berra E, Roux D, Richard DE, Pouyssegur J. Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) escapes O(2)-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep* 2001; 2 (7): 615-20.

10. Chu CY, Cheng CH, Yang CH, Huang CJ. Erythropoietins from teleosts. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65 (22): 3545-52.
11. Paus R, Bodó E, Kromminga A, Jelkmann W. Erythropoietin and the skin: a role for epidermal oxygen sensing? *Bioessays* 2009; 31 (3): 344-8.
12. Bodó E, Wiersma F, Funk W, Kromminga A, Jelkmann W, Paus R. Does erythropoietin modulate human hair follicle melanocyte activities in situ? *Exp Dermatol* 2010; 19 (1): 65-7.
13. Minson CT. Hypoxic regulation of blood flow in humans. Skin blood flow and temperature regulation. *Adv Exp Med Biol* 2003; 543: 249-62.
14. Rankin EB, Biju MP, Unger TL, et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest* 2007; 117: 1068-77.
15. Boutin AT, Weidemann A, Fu Z, et al. Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell* 2008; 133 (2): 223-34.
16. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. The role of K^+ channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension. *Microcirculation* 2006; 13: 615-32.
17. Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 2001; 101 (3): 271-6.
18. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 1996; 8 (4): 666-76.
19. Yamaji R, Okada T, Moriya M, et al. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem* 1996; 239 (2): 494-500.
20. Weidemann A, Kerdiles YM, Knaup KX, et al. The glial cell response is an essential component of hypoxia-induced erythropoiesis in mice. *J Clin Invest* 2009; 119 (11): 3373-83.
21. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999; 126: 1149-59.
22. Banks WA, Jumbe NL, Farrell CL, Niehoff ML, Heatherington AC. Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. *Eur J Pharmacol* 2004; 505: 93-101.
23. Buemi M, Lacquaniti A, Bolignano D, et al. The erythropoietin and regenerative medicine: a lesson from fish. *Eur J Clin Invest* 2009; 39 (11): 993-9.
24. Sinclair AM, Coxon A, McCaffery I, et al. Functional erythropoietin receptor is undetectable in endothelial, cardiac, neuronal, and renal cells. *Blood* 2010; 115 (21): 4264-72.
25. Swift S, Ellison AR, Kassner P, et al. Absence of functional EpoR expression in human tumor cell lines. *Blood* 2010; 115 (21): 4254-63.
26. Sturiale A, Campo S, Crascì E, et al. Erythropoietin and its lost receptor. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 (5): 1484-5.