

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE**

*Dipartimento di Scienze Biochimiche*

**DOTTORATO IN BIOCHIMICA E BIOLOGIA APPLICATA**

**XXII CICLO**

**SSD BIO/10**

***“ASPETTI DI BIOLOGIA CELLULARE DEL PDGF”***

**Dott. Alina De Donatis**

Coordinatore: Prof. Gianni Cappugi

Tutor: Prof. Paolo Cirri

---

# INDICE

<b>INDICE</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>I RECETTORI TIROSINO-CINASICI</b>	<b>5</b>
La struttura degli RTK	6
Attivazione e regolazione degli RTK	8
Alterazioni dei recettori	12
<b>IL RECETTORE DEL PDGF</b>	<b>13</b>
La molecola segnale	13
Il recettore	15
L'attivazione e la segnalazione del PDGF-R	18
Regolazione della segnalazione	26
<b>LE RISPOSTE CELLULARI INNESCAE DAL PDGF-R</b>	<b>29</b>
Migrazione cellulare	29
Proliferazione cellulare	30
Anti-apoptosi	31
<b>RUOLO FISIOLÓGICO E PATOLOGICO DEL PDGF</b>	<b>33</b>
Sviluppo embrionale	33
Sistema vascolare	34
Interazioni epitelio-mesenchima	35
Sistema Nervoso Centrale	36
Cicatizzazione delle ferite	37
Aterosclerosi	38
Fibrosi	38
Oncogenesi	39
<b>IL RUOLO DELL'ENDOCITOSI NELLA BIOLOGIA CELLULARE DEGLI RTK</b>	<b>42</b>
<b>L'IPPOSSIA E HIF</b>	<b>47</b>
La scoperta dell' <i>hypoxia inducible factor</i> (HIF)	49
Struttura di HIF	50
Regolazione di HIF	52
Attivazione di HIF in normossia	59
I geni bersaglio di HIF	61
<b>RUOLO FISIOLÓGICO E PATOLOGICO DELL'IPPOSSIA E DI HIF</b>	<b>65</b>
Regolazione dell'apoptosi e del ciclo cellulare	65
Sviluppo embrionale	67

---

Cancro	68
Ischemia	69
<b>RISPOSTE ALL'IPPOSSIA INDIPENDENTI DA HIF</b>	<b>70</b>
Regolazione della sintesi proteica	70
MicroRNA in ipossia	72
Stress replicativo	74
Modificazioni epigenetiche	75
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>77</b>
Materiali	78
Colture cellulari	78
Stimolazione e lisi cellulare	78
SDS-PAGE e Western Blot	79
Pull down assay	80
Determinazione della concentrazione proteica	80
Test di vitalità con Crystal Violetto	81
Test di proliferazione cellulare con CFSE	81
Analisi Citofluorimetriche	82
Test di <i>Wound Healing</i>	82
Test bi-dimensionale di migrazione e proliferazione	83
Trasfezioni con siRNA	83
Real-Time PCR	83
Test di internalizzazione del PDGF-R	84
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>85</b>
PREMESSA	86
<b>1. PROLIFERAZIONE E MIGRAZIONE INDOTTE DA PDGF: IL RUOLO CHIAVE</b>	
<b>DELL'ENDOCITOSI</b>	<b>88</b>
SCOPO DEL LAVORO	88
RISULTATI	91
Attivazione dose-dipendente del PDGF-R in NIH3T3	91
Proliferazione cellulare indotta da PDGF	93
Migrazione indotta da PDGF	95
Attivazione differenziale delle vie di segnalazione	99
Reversibilità della migrazione e irreversibilità della mitosi.	108
Fosforilazione sito-specifica del PDGF-R	110
Internalizzazione dose-dipendente del PDGF-R	112
Ruolo di CME e RME nella segnalazione del PDGF-R	114
	2

DISCUSSIONE	123
<b>2. LA BASSA TENSIONE DI OSSIGENO COME FATTORE DI QUIESCENZA PER CELLULE NON TRASFORMATE</b>	<b>127</b>
SCOPO DEL LAVORO	127
RISULTATI	130
Proliferazione cellulare in funzione della concentrazione di O <sub>2</sub>	130
Indice di apoptosi in funzione della tensione di O <sub>2</sub>	136
Migrazione ad alte e basse tensioni di O <sub>2</sub>	137
Attivazione ed espressione del PDGF-R	139
Il ruolo di HIF-1 $\alpha$	143
Il ruolo di HIF-2 $\alpha$	148
DISCUSSIONE	151
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>154</b>

# **INTRODUZIONE**

## I RECETTORI TIROSINO-CINASICI

La sopravvivenza degli organismi pluricellulari dipende da una complessa rete di comunicazione fra cellule, che coordina la crescita, il differenziamento e il metabolismo delle cellule nei diversi organi e tessuti. Questa comunicazione è mediata principalmente da molecole segnale extracellulari, sostanze sintetizzate da diversi tipi cellulari che inducono una risposta specifica nelle cellule bersaglio.

Tutte le cellule sono dotate di complessi sistemi per la ricezione di segnali provenienti dall'ambiente o da altre cellule, chiamati recettori. I recettori possono essere sia proteine intermembranarie del plasmalemma sia proteine citosoliche, legano la molecola segnale e trasducono l'informazione all'interno della cellula, tramite l'attivazione o il reclutamento di molecole che amplificano il segnale e infine inducono l'effetto cellulare specifico. Il ligando non ha altra funzione che quella di attivare il recettore, che quindi segnalerà alla cellula che un particolare prodotto è presente nell'ambiente. La cellula può spesso modificare o degradare il ligando e in questo modo modificare o terminare la risposta.

I recettori di membrana possono essere divisi in quattro classi:

- Recettori accoppiati a proteine G: il legame al recettore causa l'attivazione di una proteina G, che a sua volta attiva o inibisce un enzima che genera uno specifico secondo messaggero o modula un canale ionico.
- Recettori a canale ionico: il legame cambia la conformazione del recettore-canale, che permette così il passaggio di ioni attraverso di esso, il conseguente spostamento di cariche altera il potenziale elettrico di membrana.
- Recettori legati a tirosino-cinasi: il recettore non ha attività catalitica intrinseca, ma l'interazione con il ligando causa la formazione di un recettore dimerico che interagisce o attiva una o più proteine tirosino-cinasiche citosoliche.
- Recettori con attività enzimatica intrinseca: diversi tipi di recettori hanno una propria attività catalitica, che si manifesta in seguito ad interazione con il ligando. Ad esempio alcuni recettori di questo tipo causano la conversione di GMP in c-GMP, altri agiscono come fosfatasi, rimuovendo il gruppo fosfato da proteine bersaglio e modificando perciò la loro attività. I recettori di molti fattori di crescita e il recettore dell'insulina hanno attività proteino-cinastica, si

distinguono in recettori serino-treonino cinasici e recettori tirosino-cinasici, in base al sito di fosforilazione delle proteine bersaglio.

### **La struttura degli RTK**

Molti fattori di crescita, ormoni e altre molecole segnale controllano importanti risposte biologiche, quali proliferazione, differenziazione, migrazione, metabolismo e sopravvivenza, legandosi e attivando recettori con attività tirosino-cinasi intrinseca (RTK), presenti sulla superficie cellulare. Gli RTK sono importanti regolatori del livello di fosforilazione in tirosina all'interno della cellula e mediatori della segnalazione intracellulare.

Sono stati scoperti circa 60 recettori RTK, suddivisi in 16 diverse famiglie, e l'analisi del genoma umano ha confermato questo catalogo (Manning G et al., 2002). I recettori sono stati classificati in diversi gruppi in base alle caratteristiche della sequenza amminoacidica e, all'interno di ogni gruppo, le caratteristiche strutturali del dominio extracellulare determinano la specificità per il ligando. Nella porzione extracellulare si possono trovare sequenze ricche in cisteina, domini immunoglobulinici, motivi EGF, etc, presenti singolarmente o in diverse combinazioni,

- La famiglia del recettore del PDGF (*platelet derived growth factor*): recettori con un numero variabile di domini immunoglobulinici nel versante extracellulare e con una sequenza di inserzione nel dominio catalitico contenente molti siti di autofosforilazione. Fanno parte di questa famiglia, oltre al recettore del PDGF, l'SCF-R e il CSF-1R, Flk1, Flt1 e Flt4. I ligandi di questo gruppo sono gli unici che si presentano legati covalentemente a formare un dimero.
- La famiglia del recettore dell'FGF (*fibroblast growth factor*): anche i recettori di questa famiglia presentano sul lato extracellulare sequenze ripetute di tipo immunoglobulinico, di cui alcune implicate nell'interazione con il ligando, e hanno un'inserzione nel dominio cinasico.
- La famiglia del recettore insulinico: comprende il recettore per l'insulina, il recettore dell'IGF1, IRR, Ros e Ltk. I recettori di questa famiglia sono costituiti da un eterotetramero, con due catene alfa sul lato extracellulare e due catene beta che attraversano la membrana.

- La famiglia del recettore dell'EGF (*epidermal growth factor*): comprende quattro membri, EGFr, Erb-B2, Erb-B3, Erb-B4. Il recettore dell'EGF presenta due domini extracellulari glicosilati e ricchi in cisteina e fra questi due domini si trova la regione di legame per il fattore di crescita.

Tutti gli RTK presentano una struttura simile: sul versante extracellulare un grande dominio glicosilato per legare il fattore di crescita, un singolo segmento transmembrana e una porzione citoplasmatica che comprende una regione iuxtamembrana, il dominio tirosino-cinasico, e la coda carbossiterminale. Sono presenti poi sottodomini regolatori che influenzano il legame al substrato e la fosforilazione e sottodomini responsabili della dimerizzazione e dei cambiamenti strutturali conseguenti all'attivazione.

La sequenza iuxtamembrana non è molto conservata fra le varie famiglie, ma le diverse sequenze sono molto simili fra membri della stessa famiglia e sembra che questo dominio possa giocare un ruolo nella modulazione delle funzioni del recettore in risposta a stimoli diversi (Hubbard SR, 2001).

Il dominio tirosino-cinasico, che si trova nella porzione citoplasmatica del recettore, presenta due siti distinti, uno per legare il magnesio e l'ATP, l'altro è coinvolto nel meccanismo di catalisi. Questo dominio è il responsabile dell'attivazione della segnalazione cellulare e ed è quindi il più conservato nei recettori RTKs, mutazioni di una singola lisina nel sito di legame dell'ATP bloccano l'attività cinasica e inattivano completamente le funzioni biologiche del recettore.

Gli RTK differiscono molto invece nella sequenza carbossiterminale, questa regione è coinvolta nella regolazione dell'attività cinasica e contiene diversi residui di tirosina che possono essere fosforilati in seguito a stimolazione e che sono di fondamentale importanza per la trasduzione del segnale.

Data la loro struttura, gli RTKs possono essere considerati enzimi allosterici associati alla membrana, con un dominio di interazione per il ligando e un dominio tirosino-cinasico separati dalla membrana plasmatica (Ullrich A et al., 1990). Il loro compito è quello di trasferire il fosfato gamma dell'adenosina trifosfato (ATP) al gruppo idrossilico dei residui di tirosina presenti sulla propria catena polipeptidica e su quella di vari substrati.

### **Attivazione e regolazione degli RTK**

In seguito ad interazione con il ligando, l'attivazione degli RTK e la cascata di trasduzione del segnale avvengono secondo una serie di tappe comuni.

Il primo passo per l'attivazione di un RTK è la dimerizzazione, ovvero si stabilisce un'interazione fra i domini citoplasmatici di due recettori adiacenti, che sono così in grado di regolare l'attività cinasica l'uno dell'altro (Heldin CH, 1995). La dimerizzazione può avvenire fra due recettori identici (omodimerizzazione) o fra membri diversi appartenenti alla stessa famiglia (eterodimerizzazione) (Schlessinger J et al., 2000), l'eterodimerizzazione aumenta il repertorio di ligandi e permette l'attivazione di diverse vie di segnalazione.

Il modo in cui il ligando interagisce con il recettore e ne induce la dimerizzazione è specifico per ogni classe di recettori. Ad esempio, il PDGF è esso stesso in forma dimerica, quindi può interagire contemporaneamente con due recettori e favorirne la dimerizzazione (Heldin CH et al, 1989). Nel caso dell'insulina, invece, il recettore si presenta già come omodimero o eterodimero, formato da due catene polipeptidiche tenute insieme da ponti disolfuro, perciò il ligando non induce la dimerizzazione, ma probabilmente provoca un cambiamento conformazionale nel recettore, attivandolo.

Il segmento transmembrana sembra avere un ruolo attivo nella dimerizzazione degli RTK e nel corretto allineamento del recettore, necessario per l'attivazione e per la segnalazione (Burke CL et al., 1997).

La dimerizzazione indotta dal ligando causa l'attivazione del dominio catalitico, che avviene tramite trans-fosforilazione, ovvero all'interno del dimero ogni recettore fosforila l'altro su specifici residui di tirosina (Hubbard SR, 1999) (*fig. 1*). Nello stato non fosforilato il recettore ha bassa attività catalitica, a causa della conformazione di un dominio della regione cinasica, che interferisce con la sua attività, la fosforilazione del dominio cinasico rimuove l'inibizione, l'attività catalitica aumenta notevolmente e persiste per un certo tempo.

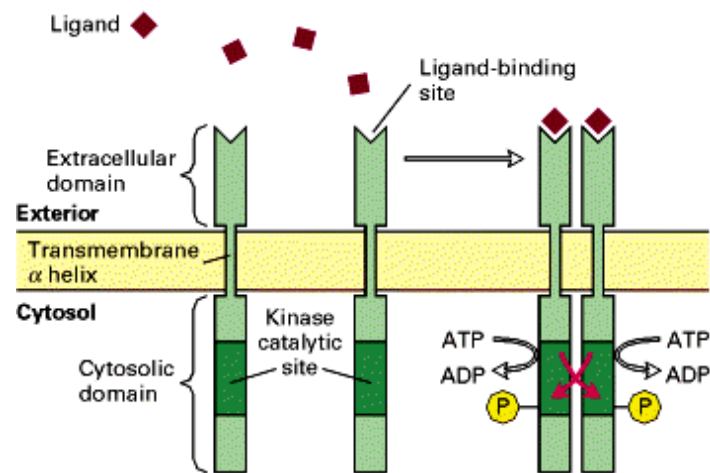


Figura 1. Attivazione dei recettori tirosino-cinasici: interazione ligando-recettore, dimerizzazione del recettore e trans-fosforilazione.

L'attivazione del dominio tirosino-cinasico causa l'autofosforilazione di specifici residui di tirosina nella regione citoplasmatica del recettore, fra cui alcune tirosine del dominio cinasico, che aumentano ulteriormente l'attività catalitica intrinseca del recettore, e tirosine presenti in zone diverse dal dominio cinasico, che creano siti di attacco per molecole bersaglio (fig.2).

Molte proteine contengono motivi con cui legano il recettore fosforilato, come i domini SH2 (*src homology domains* di tipo 2), sequenze di circa 100 amminoacidi, con una struttura globulare che sporge rispetto al resto della proteina e una tasca con sequenza conservata che serve ad interagire con le tirosine fosforilate del recettore (Booker GW et al., 1992), o i domini PTB, che interagiscono anch'essi con le tirosine fosforilate.

Le proteine che si legano al recettore fosforilato possono essere proteine adattatrici, che fanno da intermedio fra il recettore e le proteine segnalatorie a valle, oppure enzimi, la cui attività è regolata direttamente dal recettore per fosforilazione e che a livello della membrana trovano i substrati con cui interagire, o anche proteine strutturali che vengono fosforilate e attivate dal recettore e mediano i riarrangiamenti della membrana e del citoscheletro.

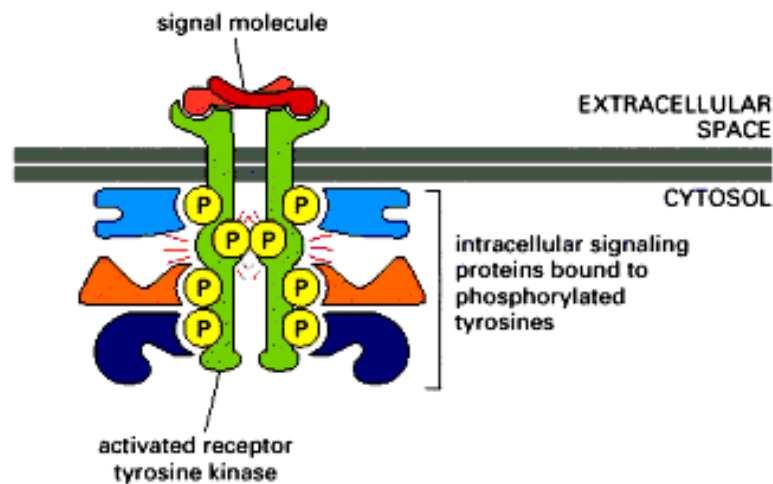


Figura 2. Le Tyr fosforilate del recettore creano siti di attacco per le molecole segnale.

I vari componenti delle vie di trasduzione interagiscono tramite i domini SH2, PTB o di altro tipo, come i domini SH3, caratterizzati da una sequenza di circa 60 amminoacidi con struttura globulare, che lega corte sequenze ricche in prolina, i domini PH che riconoscono e legano i fosfolipidi di membrana, o i domini PDZ che legano residui di valina C-terminali in un particolare contesto.

Ad esempio Grb2 è un importante adattatore della via di segnalazione ras/raf/MAPK, contiene sia sequenze SH2 sia SH3, in questo modo può legare una proteina citoplasmatica tramite il dominio SH3 e portarla al recettore RTK attivato a cui si lega tramite SH2.

Le vie di segnalazione più conosciute degli RTK sono la via ras/MAPK e la via PI3chinasi/Akt, ma ne sono state descritte molte altre, ad esempio l'EFG-R stimola direttamente la fosforilazione e la traslocazione nucleare di molecole segnale e di attivatori della trascrizione come STAT (fig.3).

Inoltre gli RTK o i loro frammenti proteolitici possono essere attivi anche all'interno della cellula e addirittura nel nucleo, dove potrebbero agire direttamente come fattori trascrizionali. (Wells et al., 2002).

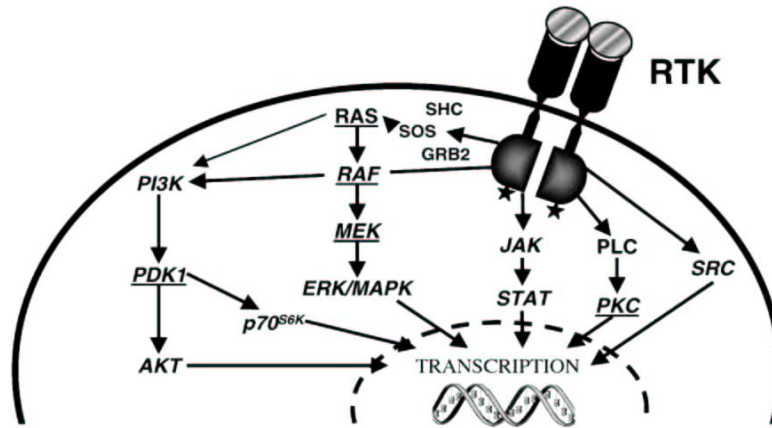


Figura 3. Vie di segnalazione dei recettori tirosino-cinasi e attivazione della trascrizione

Gli RTK svolgono un ruolo fondamentale nella segnalazione cellulare, perciò la loro attività deve essere finemente regolata.

Si ha un controllo a livello genico sulla trascrizione e traduzione dei geni dei recettori e dei rispettivi ligandi, poi c'è anche una regolazione specifica del recettore attivo, che determina l'intensità e la durata della segnalazione.

Il primo livello di regolazione è il dominio catalitico stesso, la cui fosforilazione controlla direttamente l'attività cinasica (Hubbard SR et al., 1998); lo stato di fosforilazione del recettore è controllato poi in modo specifico dall'attività delle proteine fosfatasi, che rimuovono il gruppo fosfato dalle tirosine dei recettori e in questo modo li inattivano (Ostman A, Bohmer FD, 2001). Un altro importante meccanismo di regolazione è la *down regulation*, ovvero l'endocitosi del complesso ligando-recettore, che allontana il recettore dalla superficie cellulare; il recettore, una volta endocitato può seguire destini diversi, può essere degradato in seguito a fusione dell'endosoma con un lisosoma, oppure essere riciclato e riportato sulla superficie cellulare.

Le proteine tirosino-fosfatasi (PTPs) catalizzano la rimozione del gruppo fosfato da residui di fosfotirosina tramite una reazione idrolitica, con una funzione opposta alle protein cinasi. Le PTP hanno prima di tutto la funzione di mantenere bassi i livelli di fosforilazione in tirosina del recettore in assenza di ligando, infatti, se si trattano le cellule con inibitori delle PTP si ha un'attivazione ligando-indipendente del recettore. Le fosfatasi poi controllano anche i livelli di fosforilazione del recettore in forma attiva: gli RTK, dopo essere stati attivati dal ligando e aver segnalato per un

certo tempo, vanno incontro a rapida defosforilazione ed inattivazione per opera di specifiche fosfatasi.

Le PTP sono a loro volta finemente regolate e, in quanto potenti regolatori degli RTK, sono oggetto di studio come bersaglio di nuovi farmaci per patologie correlate ad un malfunzionamento degli RTK.

### **Alterazioni dei recettori**

Un'alterazione o un mal funzionamento degli RTK può causare l'insorgere di diverse patologie, prima fra tutte la trasformazione neoplastica (Blume-Jensen P, Hunter T, 2001).

Nelle cellule tumorali gli RTK sono spesso costitutivamente attivi, a causa di mutazioni della sequenza genica o di alterazioni dell'espressione.

In alcuni casi si può avere la trasduzione, ad opera di un retrovirus, di un protooncogene che altera il gene normale; ad esempio il virus dell'eritroblastosi aviaria trasduce l'oncogene v-erbB, che codifica un recettore EGF-R tronco, con delezione del dominio di legame, un altro esempio è l'oncogene v-ros, che differisce dal gene cellulare c-ros in quanto manca quasi completamente del dominio extracellulare e presenta un'inserzione di tre amminoacidi nel segmento transmembrana che rende la molecola costitutivamente attiva.

Anche l'overespressione di un recettore normale spesso contribuisce alla trasformazione neoplastica. ErbB2, ad esempio, inizialmente fu identificato come gene amplificato nello sviluppo del tumore del seno e delle ghiandole salivari; ErbB2 è coinvolto infatti in molti tipi di carcinomi, come il tumore al seno o all'utero, il carcinoma a cellule squamose e il glioblastoma, nei quali il gene è normale, ma è amplificato o overespresso.

## IL RECETTORE DEL PDGF

### La molecola segnale

Il *Platelet derived growth factor* (PDGF) fu uno dei primi fattori di crescita ad essere caratterizzato, fu scoperto inizialmente come costituente del siero e purificato dai granuli  $\alpha$  delle piastrine, i principali siti di accumulo di questo fattore, (Antoniades HN et al.,1979; Heldin CH,1979), successivamente fu trovato in vari altri tipi cellulari.

Il PDGF è proteina dimerica, formata da due catene polipeptidiche tenute insieme da ponti disolfuro; fino ad oggi sono stati scoperti cinque diversi dimeri, formati da quattro catene polipeptidiche diverse, A, B, C e D, che sono codificate da altrettanti geni.

Inizialmente furono identificate le catene proteiche A e B, queste sono lunghe circa 100 residui amminoacidici ciascuna, presentano otto residui di cisteina molto ben conservati, due dei quali sono coinvolti nel legame con l'altra subunità del dimero, mentre gli altri formano legami disolfuro intracatena. Le catene A e B sono sintetizzate come precursori, subiscono un taglio proteolitico a livello della sequenza N-terminale e, nel caso della catena B, anche della sequenza C-terminale. Le piastrine e tutte le cellule che normalmente esprimono sia la catena A che la B, assemblano i dimeri in modo casuale e contengono perciò tre isoforme di PDGF (AA, AB, BB).

Le catene C e D del PDGF sono state isolate più recentemente (Bergsten E et al., 2001; La Rochelle WJ et al., 2001; Li X et al., 2000) sono lunghe rispettivamente 345 e 370 residui amminoacidici, presentano una struttura a due domini, un dominio CUB N-terminale e un dominio PDGF/VEGF (*vascular endothelial growth factor*) C-terminale. Le forme del PDGF C e D sono secrete come omodimeri (CC e DD) e non ci sono prove che esista l'eterodimero; il dominio CUB, di circa 110 amminoacidi, deve essere rimosso affinché la proteina possa legare e attivare il recettore. Il PDGF C presenta gli otto residui di cisteina tipici del gruppo e altre quattro cisteine caratteristiche, localizzate fra questi; il PDGF D manca invece della quinta cisteina, ma questo non sembra alterare la sua attività biologica.

Le quattro isoforme di PDGF sono codificate da geni che presentano un'organizzazione simile. I geni delle catene A e B del PDGF si trovano sui cromosomi 7 e 22 (Betsholtz C et al., 1984) e sono organizzati in sei esoni: l'esone 1 codifica per la sequenza segnale, gli esoni 2 e 3 per sequenze della proteina precursore che vengono rimosse durante il processamento, gli esoni 4 e 5 codificano per gran parte della proteina matura, l'esone 7 è prevalentemente non codificante; l'esone 6 codifica per una sequenza N-terminale, che viene rimossa nella maturazione della catena B, mentre nella catena A può essere o non essere rimossa, dando luogo a due diverse forme di splicing. I geni delle catene C e D si trovano sui cromosomi 4 e 11 (Uutela M et al., 2001), hanno organizzazione simile ai geni delle catene A e B del PDGF, anche se sono molto più lunghi, per la presenza di una sequenza intronica; la struttura in esoni è simile, con la differenza che i domini 2 e 3 codificano per il dominio CUB.

Il PDGF è sintetizzato da molti tipi cellulari e la sua sintesi è spesso aumentata in risposta a stimoli esterni, come l'esposizione alla bassa tensione di ossigeno, la presenza di trombina, di fattori di crescita o citochine. Molte cellule esprimono diversi tipi di catene del PDGF, ma la loro espressione è regolata in maniera indipendente sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale.

A livello genico ci sono diverse sequenze coinvolte nella regolazione della trascrizione, ad esempio le regioni dei promotori contengono diverse sequenze regolatrici, nel gene del PDGF B si trova il cosiddetto elemento prossimale di sis (SPE) a livello dei nucleotidi - 64 - 45, che lega i fattori trascrizionali Sp1 e Sp3, mentre nel gene del PDGF A, a livello dei nucleotidi - 115 - 33, ci sono zone ricche in GC che legano i fattori Sp1 e Egr-1, e regolano l'attivazione del promotore; ci sono poi sequenze che legano fattori di trascrizione come AP-1 e Ets, e anche elementi coinvolti nella trascrizione del PDGF indotta da trombina. Il gene PDGF C ha un promotore molto simile a quello di A, con sequenze ricche in GC, mentre si sa poco del promotore del gene D.

Un secondo livello di regolazione si ha sulla traduzione del messaggero, ad esempio, l'm-RNA precursore di 3,5 Kb del gene del PDGF B contiene una lunga sequenza non tradotta in 5', che agisce da inibitore della traduzione; con il processamento questa sequenza viene persa, e i due trascritti di 2,8 Kb e 2,6 Kb non presentano più effetto inibitorio.

Nei geni del PDGF A e B l'esone 6 codifica per una sequenza che media le interazioni con la matrice e che può causare anche ritenzione della molecola all'interno della cellula produttrice (è detta sequenza di ritenzione). Il PDGF interagisce con la matrice legandosi a vari tipi di collagene, come la trombospondina, il complesso osteopontina/SPARC e l'eparan-solfato, con un legame elettrostatico tra i residui basici del PDGF e le cariche negative dell'eparan-solfato. Nel caso della catena B, il precursore contiene ancora la sequenza di ritenzione e può essere trattenuto nella matrice, in seguito a maturazione, la sequenza C-terminale viene rimossa e la molecola può diffondere. Per la catena A esistono invece due forme di splicing: una forma più corta, priva della sequenza C-terminale, che può diffondere nei tessuti e agire a distanza, e una seconda forma più lunga, con la sequenza C-terminale intatta, che viene trattenuta dalla matrice e agisce sulla cellula produttrice e sulle cellule vicine.

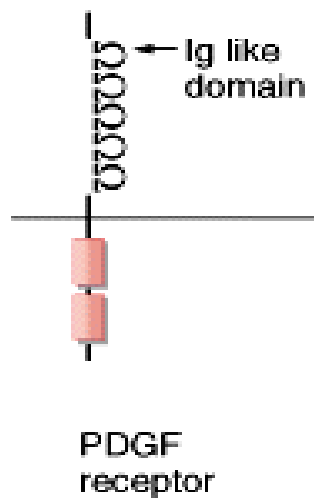
Il PDGF non interagisce solo con le molecole della matrice, ma anche con proteine solubili. Ad esempio, l'omodimero BB può legare la  $\alpha$ 2-macroglobulina, che in questo modo regola la quantità di PDGF disponibile per i recettori; da cellule della retina del topo è stata isolata una proteina che lega il PDGF (detta proteina associata al PDGF, o PAP), che lega sia la forma A che la B e ne regola diversamente l'attività (Fisher WH, Schubert D, 1996).

Con studi di mutagenesi sono stati localizzati gli epitopi responsabili del legame con il recettore, che si trovano nel loop 1 e 3, ma sembra coinvolto anche il loop 2 (Andersson JG et al., 1995; Clements JM et al., 1991), ogni molecola di PDGF contiene due epitopi simmetrici, derivanti dalla struttura di entrambe le catene.

## **Il recettore**

Il recettore del PDGF (PDGF-R) esiste in due diverse isoforme, chiamate  $\alpha$  e  $\beta$ . Il gene del recettore  $\alpha$  si trova sul locus cromosomico 4q12, il gene del recettore  $\beta$  sul locus 5q33; i due geni sono trascritti in m-RNA, il quale viene poi tradotto in una proteina precursore, successivamente glicosilata a livello del reticolo endoplasmatico, fino ad ottenere la forma matura dei due recettori, con peso molecolare rispettivamente di 170 e 180 KDa.

Entrambe le isoforme presentano una struttura di questo tipo: una regione extracellulare con cinque domini immunoglobulinici, un segmento transmembrana, un dominio regolatore iuxtamembrana, un dominio cinasico e una coda citoplasmatica (*fig.4*). Il dominio cinasico contiene una sequenza di inserzione caratteristica, tipica di questa classe e priva di omologia con quelle di altri RTK (Claesson Welsh L et al.,1989; Matsui T et al.,1989; Yarden Y et al.,1986).



*Figura 4. Struttura del recettore del PDGF: regione extracellulare con cinque domini immunoglobulinici, segmento transmembrana, dominio regolatore iuxtamembrana, dominio cinasico e coda citoplasmatica*

Gli epitopi del recettore coinvolti nel legame con il PDGF si trovano nei tre domini immunoglobulinici più esterni, il più importante per il legame sembra essere il dominio Ig2 (Lokker NA et al.,1997; Miyazawa K et al.,1998).

Come detto precedentemente, il PDGF, essendo dimerico, può interagire con due recettori contemporaneamente e favorirne la dimerizzazione (Bishayee S et al.,1989; Heldin CH et al.,1989). Le due isoforme del recettore si associano dando luogo a tre diversi tipi di dimero:  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ ,  $\alpha\beta$ , i quali attivano diverse e specifiche vie di trasduzione. Una volta formato, il dimero è stabilizzato da interazioni dirette recettore-recettore a livello dei domini Ig4 (Omura T et al.,1997), anche la formazione del complesso fra fattore di crescita e recettore sembra coinvolgere interazioni dirette fra i recettori.

Le isoforme di PDGF hanno affinità diversa per i tre recettori: il PDGF AA attiva solo il dimero  $\alpha\alpha$ , il PDGF AB e il PDGF CC possono attivare sia il recettore  $\alpha\alpha$  sia il  $\beta\beta$ , il PDGF BB attiva tutte e tre le isoforme (Seifert RA et al.,1989; Kanakaraj P et al.,1991), mentre il PDGF DD attiva solo il recettore  $\beta\beta$  (Bergsten E et al., 2001; Gilbertson DG et al., 2001) (*fig.5*).

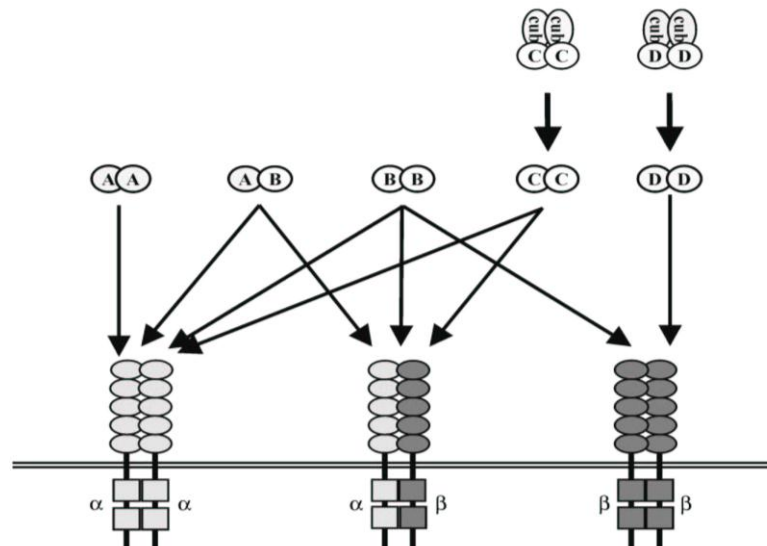


Figura 5. I vari tipi di PDGF (PDGF AA, BB, AB, CC, DD) interagiscono solo con alcune forme di omodimero e eterodimero dei recettori  $\alpha$  e  $\beta$ .

I diversi dimeri di PDGF-R trasducono segnali cellulari simili, ma non identici. L'eterodimero è ancora poco conosciuto, mentre si hanno molte più informazioni sul ruolo funzionale dei due omodimeri  $\alpha\alpha$  e  $\beta\beta$ . Entrambi trasducono potenti segnali mitogeni, anche se la forma  $\alpha$  sembra essere più mitogenica; entrambi causano la riorganizzazione dell'actina, ma solo la forma  $\beta\beta$  provoca la comparsa di caratteristiche strutture circolari sulla superficie dorsale della cellula (Eriksson A et al.,1992). L'attivazione della forma  $\beta$  stimola la chemiotassi, mentre sembra che l'attivazione della forma  $\alpha$  possa stimolarla in alcune cellule, e inibirle in altre, come fibroblasti e cellule muscolari lisce (Siegbalhn A et al., 1990; Yokote K et al., 1996). Entrambi i recettori, ma soprattutto la forma  $\beta$ , mediano l'incremento della concentrazione intracellulare di  $Ca^{2+}$ .

I recettori  $\alpha$  e  $\beta$  legano diversamente il PDGF e trasducono segnali diversi, perciò la risposta di una cellula alla stimolazione dipenderà dal tipo di recettori che possiede. Le cellule comunemente bersaglio del PDGF sono i fibroblasti e le cellule muscolari

lisce, che esprimono entrambi i recettori, ma maggiormente la forma  $\beta$ ; altre cellule esprimono solo la forma  $\alpha$  (come le piastrine e i precursori gliali O-2A), altre solo la forma  $\beta$  (ad esempio le cellule dell'endotelio capillare nel topo).

L'espressione dei recettori del PDGF nelle cellule non è costante, ma dipende dalle condizioni fisiologiche e dalla presenza di altri fattori stimolanti la crescita. Ad esempio, nelle cellule connettivali l'espressione dei recettori normalmente è bassa, ma aumenta in stato di infiammazione (Rubin K et al.,1988), mentre nel topo un trattamento con estrogeni aumenta l'espressione del recettore nell'utero e nella vagina (Gray K et al.,1995).

Altri fattori, come l'FGF, il lipopolisaccaride, l'interleuchina 1 e il *tumor necrosis factor* (TNF) possono aumentare o ridurre selettivamente l'espressione di uno dei due tipi di recettore, con effetti differenti sui diversi tipi cellulari.

### **L'attivazione e la segnalazione del PDGF-R**

L'attivazione del recettore del PDGF, come per tutti gli RTK, dipende dalla formazione del dimero indotta dal ligando, le regioni intracellulari dei due recettori adiacenti interagiscono e si ha trans-fosforilazione su residui di tirosina.

Il PDGF dimerico interagisce con il proprio recettore, si ha dimerizzazione e attivazione del dominio catalitico del recettore (*fig.6*). Il primo evento conseguente all'attivazione del dominio cinasico è l'autofosforilazione del recettore, e la soppressione dell'attività delle fosfatasi. L'autofosforilazione ha due importanti funzioni: primo, la fosforilazione di uno specifico residuo di tirosina (Tyr<sup>849</sup> nel recettore  $\alpha$  e Tyr<sup>857</sup> nel recettore  $\beta$ ) porta ad un incremento dell'efficienza catalitica delle cinasi (Fantl WJ et al., 1989; Kazlauskas A, Cooper JA, 1989), secondo, l'autofosforilazione su residui al di fuori del dominio cinasico crea siti di legame per molecole segnale contenenti domini SH2.

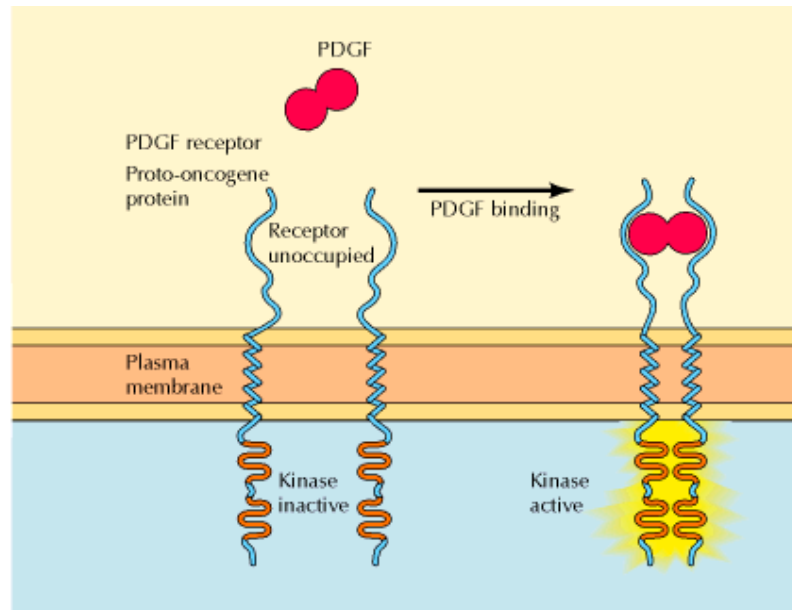


Figura 6. Attivazione del PDGF-R: il PDGF è una molecola di forma dimerica, interagisce contemporaneamente con due recettori favorendone la dimerizzazione.

Il meccanismo di inibizione delle fosfatasi coinvolge la produzione di perossido di idrogeno dipendente da PDGF (Sundaresan M, 1995). L'aumento di perossido di idrogeno causa l'ossidazione di una cisteina essenziale nel sito catalitico delle fosfotirosino-fosfatasi, e le inattiva (Meng TC et al., 2002); la produzione del perossido di idrogeno dipende dall'attivazione della PI3K (*phosphoinositide 3 kinase*), un enzima attivato dalle vie di segnalazione del recettore, quindi l'inattivazione delle fosfatasi serve principalmente ad amplificare la fosforilazione in tirosina.

Nel giro di pochi minuti dall'attivazione del recettore vengono reclutate molte proteine coinvolte nelle vie di segnalazione. La fosforilazione del PDGF-R su specifici residui di tirosina crea i siti di legame per proteine che possiedono domini SH2, queste si legano al recettore fosforilato, vengono traslocati alla membrana cellulare e hanno così più facile accesso ai substrati con cui devono interagire.

Molte proteine con domini SH2 sono in grado di legare sia il recettore  $\alpha$  sia il  $\beta$ , alcune sono enzimi, come PI3K, PLC- $\gamma$  (*phospholipase C gamma*), le cinasi della famiglia di Src, le tirosino-fosfatasi SHP-2, e una GAP (*GTPase activating protein*) di Ras, altre, come Grb2, Grb7, Nck, Shc e Crk sono molecole adattatrici, cioè collegano il recettore alle molecole a valle della via di trasduzione.

Anche alcuni membri della famiglia di STAT legano il PDGF-R, questi sono fattori trascrizionali che, in seguito a fosforilazione, dimerizzano e migrano nel nucleo, dove attivano la trascrizione di specifici geni.

Ogni molecola con dominio SH2 che si lega al PDGF-R attiva una diversa via di trasduzione del segnale (*fig.7*):

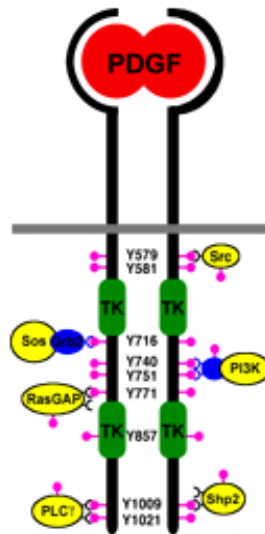


Figura 7. Le Tyr fosforilate sul recettore attivo creano siti di legame per le molecole segnale.

### Fosfatidil-inositolo 3 cinasi

I membri della famiglia delle PI3K che interagiscono con i recettori tirosino-cinasi sono proteine formate da una subunità regolatrice p85 e una subunità catalitica p110. Il loro principale substrato è il fosfatidil-inositolo 4,5 bisfosfato, che viene fosforilato a fosfatidil-inositolo 3,4,5 trisfosfato (PIP3). In seguito a legame con il PDGF-R (tramite le tirosine fosforilate del recettore Tyr<sup>740</sup> e Tyr<sup>751</sup>), la subunità p85 subisce un cambiamento conformazionale, che viene trasmesso alla subunità p110 e la attiva; l'enzima si trova così ancorato tramite il recettore alla membrana, dove può interagire con i suoi substrati. La PI3K ha un ruolo centrale nella trasduzione del segnale all'interno della cellula: può essere attivata da molti segnali diversi, ha un gran numero di molecole effettrici a valle, e media molte diverse risposte cellulari, come la riorganizzazione dell'actina, la chemiotassi, la crescita cellulare e gli effetti anti-apoptotici. La PI3K ad esempio attiva alcuni membri della famiglia di Rho,

piccole proteine G monomeriche, che sembrano essere importanti per la riorganizzazione dell'actina e per la chemiotassi (Hawkins PT et al., 1995; Hooshmand-Rad R et al., 1997). In particolare la PI3K attiva Rho, che è coinvolta nella formazione di fibre da stress, Rac, responsabile del fenomeno di *ruffling* delle membrane, e Cdc42, necessaria per la formazione di filopodi. Il PIP3, formato dalla PI3K è coinvolto nell'attivazione di due serina-treonina cinasi, PKB (conosciuta anche come Akt) e PDK1 (*phosphatidylinositol dependent kinase 1*), importanti per i loro effetti proliferativi e anti-apoptotici (Dudek HS et al., 1997; Kauffmann-Zeh A et al., 1997). Sia PDK1 che PKB si legano tramite un dominio PH al PIP3 a livello della membrana. PKB viene fosforilata da PDK1 sul residuo Thr<sup>308</sup>; in seguito alla fosforilazione diviene attiva e fosforila diversi substrati, tra cui Bad e il fattore di trascrizione Fkhr1, sopprimendo il loro effetto pro-apoptotico. Tramite Rac, che media l'attivazione della NADPH-ossidasi, la PI3K è coinvolta anche nella produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Questa è essenziale per l'inattivazione delle fosfatasi e quindi per il mantenimento della fosforilazione in tirosina e per l'attivazione del recettore.

### Fosfolipasi C- $\gamma$

Il recettore attivato recluta anche la PLC- $\gamma$ , un enzima con due domini SH2, un dominio SH3 e due domini PH. Il legame della PLC- $\gamma$  al PDGF-R comporta la fosforilazione di questo enzima su specifici residui di tirosina, e l'aumento della sua attività catalitica (Meisenhelder J et al., 1989).

La piena attivazione della PLC- $\gamma$  dipende dalla PI3K, poiché l'inositolo 3,4,5 trisfosfato formato da questo enzima lega il dominio PH della PLC- $\gamma$  e può ancorarla alla membrana. La PLC- $\gamma$  agisce sugli stessi substrati della PI3K, come il fosfatidilinositolo 4,5 bisfosfato, generando due messaggeri con diverse e specifiche funzioni: l'IP3 (inositolo 1,4,5 trisfosfato) e il DAG (diacilglicerolo).

L'IP3 ha la funzione di mobilitare il Ca<sup>2+</sup> dalle riserve cellulari (Berridge MJ, 1993); è una molecola polare, migra nel citosol, e agisce come fattore allosterico positivo sui canali del Ca<sup>2+</sup> del reticolo endoplasmatico. In seguito all'apertura dei canali, la concentrazione del Ca<sup>2+</sup> aumenta sensibilmente nel citosol e porta all'attivazione di alcuni enzimi, tra cui la fosfolipasi A2, che stacca l'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana e lo rende disponibile per la sintesi di molecole coinvolte nella risposta infiammatoria (prostaglandine e leucotrieni). Il Ca<sup>2+</sup> si lega anche alla

calmodulina, e il complesso  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina attiva vari enzimi, tra cui le CaMPK (cinasi attivate da calmodulina), l'adenilato ciclasi, la NO-sintasi (ossido nitrico sintasi), etc, generando diverse risposte cellulari.

Il DAG invece resta ancorato alla membrana e porta all'attivazione di una serina-treonina cinasi, la PKC. La PKC presenta un dominio *calmodulin-like*, tramite il quale lega  $\text{Ca}^{2+}$ , questo legame causa un riarrangiamento conformazionale e permette la traslocazione della proteina alla membrana, dove viene attivata dal DAG. La PKC attiva fosforila varie proteine, tra cui lo scambiatore  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , che contribuisce all'alcalinizzazione del citoplasma.

### Src

Le tirosino-cinasi della famiglia di Src sono proteine ancorate alla membrana e caratterizzate dalla presenza di un dominio catalitico, un dominio SH3 e un dominio SH2. Nella forma inattiva un residuo fosforilato di tirosina a livello della coda C-terminale (Tyr<sup>527</sup>) media le interazioni con altre molecole che mantengono la cinasi inattiva; il legame tramite il dominio SH2 al PDGF-R fosforilato comporta la defosforilazione della tirosina C-terminale e la fosforilazione di altre tirosine (tra cui Tyr<sup>416</sup>), nei domini SH2 e SH3, che porta all'attivazione di Src.

Src è coinvolto sia nel riarrangiamento del citoscheletro sia nell'induzione della duplicazione cellulare. Src nella forma attiva fosforila varie proteine del citoscheletro, proteine delle placche di adesione, come FAK (*focal adesion kinase*) e le integrine, che, se fosforilate, diminuiscono l'adesività cellulare. Inoltre induce l'attivazione del fattore di trascrizione c-myc, coinvolto nella regolazione della trascrizione delle cicline e quindi nella progressione del ciclo cellulare. Sembra che Src sia di fondamentale importanza per la risposta mitogenica al PDGF, dal momento che somministrazioni di anticorpi bloccanti o l'overespressione di dominante negativo di Src causano inibizione della crescita mediata da PDGF (Twamley-Stein GM et al.,1993).

### Grb2/Sos

Grb2 è una molecola adattatrice, contenente un dominio SH2 e due domini SH3. Il dominio SH2 può legare direttamente il PDGF-R fosforilato, oppure può interagire con il recettore indirettamente tramite altri componenti, come Shc o SHP2, questi si legano al PDGF-R, vengono fosforilati su residui di tirosina e possono essere

riconosciuti dal dominio SH2 di Grb2. Tramite i domini SH3 invece lega Sos, un fattore di scambio nucleotidico di Ras, che converte la forma inattiva Ras-GDP nella attiva Ras-GTP.

L'attivazione di Ras è di grande importanza per molte risposte cellulari: la forma attiva di Ras si lega alla serina-treonina cinasi Raf, che attiva la cascata del segnale delle MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), una via coinvolta nella stimolazione della crescita cellulare, nella migrazione e nel differenziamento.

Raf, una volta attivata da Ras, lega e attiva MEK (o MAPKK, *mitogen-activated protein kinase kinase*), fosforilandola su residui di serina; questa a sua volta attiva le MAPK chiamate Erk 1 e Erk2 (*extracellular signal-regulated kinase*), fosforilandole su un residuo di tirosina e su uno di treonina separati nella sequenza da un acido glutammico (*fig8*). Le MAPK attive sono in grado di fosforilare e attivare vari substrati contenenti la sequenza di riconoscimento Pro-X-Ser/Thr-Pro. Fra i substrati ci sono varie proteine del citoscheletro, come Rho, Cdc42 e Rac, la fosfolipasi A2 e anche alcune cinasi quali il PDGF-R stesso, Raf e MEK. Ciò suggerisce che le MAPK siano in grado di regolare la loro stessa via di attivazione con un meccanismo a *feedback* negativo. Le MAPK possono anche traslocare nel nucleo e attivare vari fattori di trascrizione, come Jun e Fos (attivatori trascrizionali di proteine essenziali nell'attivazione della mitosi), attivano anche la S6 cinasi, che fosforila e attiva il fattore ribosomiale S6 e determina un aumento della sintesi proteica (Kondoh K et al., 2005).

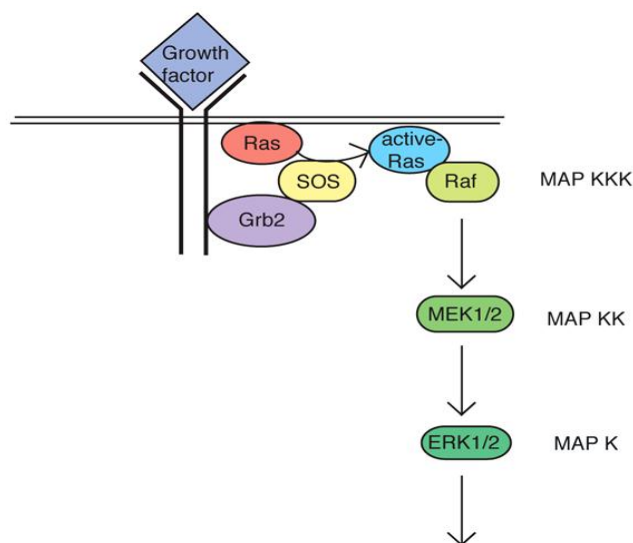


Figura 8. Via di segnalazione del PDGF-R che porta ad attivazione delle MAPK

### SHP-2

SHP-2 è una tirosino-fosfatasi contenente due domini SH2 nella regione N-terminale, perché si abbia una piena attivazione dell'enzima i due domini devono legarsi entrambi a residui di tirosina fosforilati del recettore (Pluskey ST et al., 1995).

SHP-2 è principalmente un modulatore negativo della segnalazione del recettore del PDGF, perché è in grado di defosforilare sia i recettori del PDGF sia i substrati del recettore (Klinghoffer RA, Kazlauskas A, 1995). In certe condizioni SHP-2 può partecipare anche positivamente alla segnalazione, ad esempio defosforila i residui di tirosina C-terminali di Src, contribuendo alla sua attivazione, inoltre può legare Grb/Sos e permettere così l'attivazione di Ras, favorendo la segnalazione mitogenica (Roche S et al., 1996).

### GAP

La GAP (*GTPase activating protein*) di Ras è una proteina contenente due domini SH2 che si legano alla Tyr<sup>771</sup> del PDGF-R  $\beta$ , ma non all' $\alpha$  (Kashishian A et al., 1992; Heidarman MA et al., 1993). Ras, come tutte le proteine G monomeriche, è regolata nella sua attività da due classi di proteine: le GEF (*GDP exchange factor*) e le GAP. La GEF di Ras è rappresentata da Sos, che fa da attivatore, favorendo l'uscita del GDP e il legame con il GTP, mentre GAP favorisce l'idrolisi del GTP in GDP + Pi, convertendo la Ras-GTP attiva nella forma Ras-GDP, inattiva. Quando si lega al recettore, la GAP viene fosforilata ed inibita, e permette perciò il mantenimento dell'attivazione di Ras mediata dal PDGF-R.

### STAT

La famiglia di STAT (*signal transducer and activator of transcription*) comprende sette membri, fra i quali Stat1, Stat3, Stat5 e Stat6 si legano al PDGF-R  $\beta$  attivo (legando le Tyr<sup>579</sup>, Tyr<sup>581</sup>, Tyr<sup>775</sup>) e vengono fosforilati, in alcuni casi possono legarsi debolmente anche al recettore  $\alpha$ . L'associazione di questi fattori al recettore è sempre accompagnata dall'interazione con specifiche tirosino-cinasi dette JAK (*Janus kinases*), anche se il loro ruolo nell'attivazione di STAT non è ancora chiaro.

In seguito a fosforilazione, STAT dimerizza, formando omodimeri o eterodimeri, che migrano nel nucleo, dove agiscono come fattori trascrizionali per geni coinvolti nella regolazione della fase G1 del ciclo cellulare (Yamamoto H et al., 1996; Novak U et al., 1996).

### Adattatori

Gli adattatori sono molecole prive di attività catalitica, si legano al PDGF-R tramite domini SH2 e collegano così il recettore con le molecole effettrici a valle. Esempi di adattatori sono la subunità regolatrice della PI3K e la molecola Grb2, oltre a questi si legano al PDGF-R anche le molecole adattatrici Shc, Grb7, Grb10, Grb14, Nck e Crk. Shc si lega al PDGF-R e viene fosforilato sui residui Tyr<sup>317</sup>, Tyr<sup>239</sup> e Tyr<sup>240</sup>; la Tyr<sup>317</sup> è riconosciuta da Grb2/Sos e contribuisce all'attivazione di Ras, le altre due Tyr fosforilate invece attivano la via di segnalazione coinvolta nell'induzione del gene c-myc (Gotoh N et al., 1997). Grb7 si comporta in modo simile a Grb2, ha un dominio SH2, un dominio PH e un dominio detto GM; anche altri membri della famiglia Grb (Grb10 e Grb14) si legano al recettore attivo, ma la loro funzione non è chiara. Nck presenta un dominio SH2 e tre domini SH3, interagisce sia con il recettore  $\beta$  sia con l' $\alpha$ , è coinvolto nell'attivazione delle serina-treonina cinasi JNK/SAPK (*c-Jun N-terminal kinase / Stress-activated protein kinase*), attraverso l'interazione con le cinasi PAK1 (*p21-activated kinase 1*) e NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) (Bokoch GM et al., 1996; Su YC et al., 1997). Crk si lega al recettore  $\alpha$  e forma un complesso con le proteine Cas e C3G, collegate all'attivazione di JNK/SAPK (Tanaka S et al., 1997).

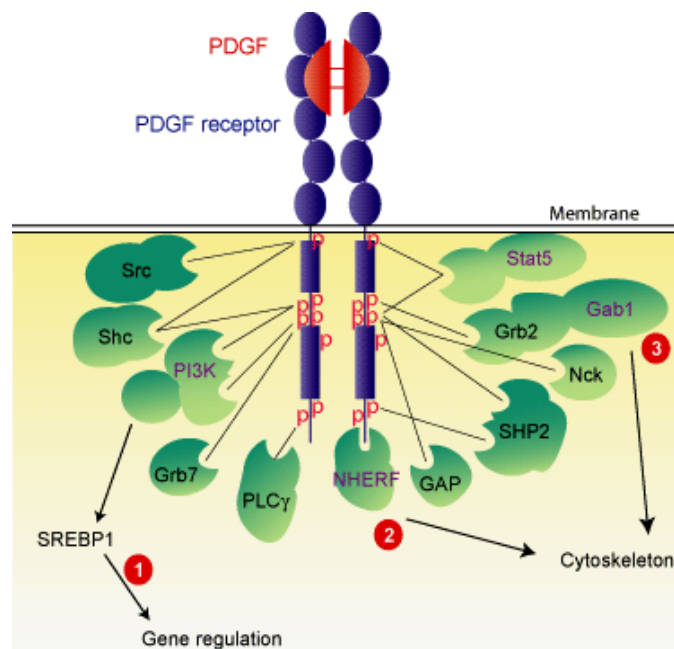


Figura 9. Proteine adattatrici e molecole segnale che interagiscono con le Tyr fosforilate del recettore attivo.

### Regolazione della segnalazione

La segnalazione del PDGF-R è coinvolta in meccanismi di importanza cruciale per la fisiologia cellulare, perciò la sua attività deve essere strettamente controllata. Esistono diversi meccanismi di modulazione della segnalazione del PDGF-R: uno dei principali consiste nell'inattivazione del recettore da parte di alcune tirosinofosfatasi, che agiscono defosforilando e quindi inattivando il PDGF-R, un secondo importante meccanismo di inattivazione del recettore si basa sulla sua internalizzazione e degradazione.

L'inattivazione delle fosfatasi è una strategia messa in atto dalla cellula per potenziare la segnalazione dei recettori, evitando che essi siano rapidamente defosforilati. La stimolazione degli RTK induce un aumento transiente di ROS (*reactive oxygen species*) all'interno della cellula, questi causano l'ossidazione dei residui di cisteina del sito attivo delle PTP, che in questo modo diventano inattive e quindi incapaci di defosforilare il PDGF-R. La produzione di ROS avviene attraverso la via della PI3K, che porta all'attivazione di Rac1, la quale a sua volta attiva la NADPH ossidasi (Bae YS et al., 2000) (*fig.10*).

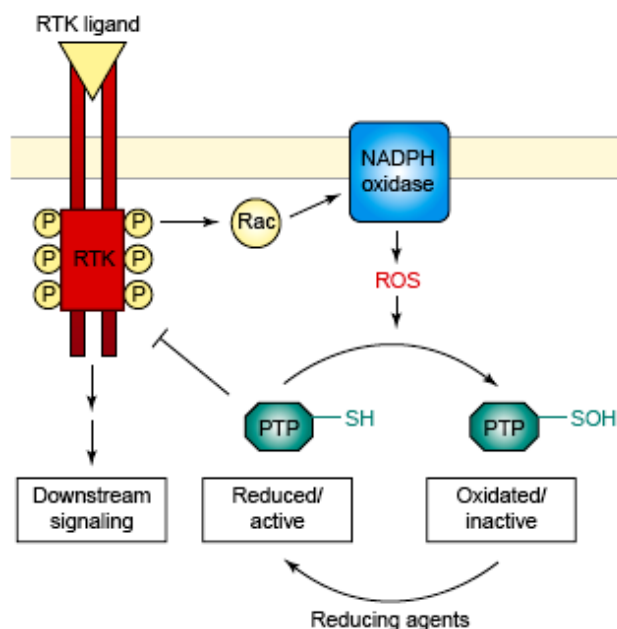


Figura 10. La stimolazione degli RTK porta all'attivazione dell'enzima NADPH ossidasi, il quale causa la formazione di ROS, che inattivano le PTP, ossidando i residui di cisteina del loro sito attivo.

Molti dati confermano l'importanza dei ROS nella regolazione della segnalazione attivata dai fattori di crescita. Ad esempio, un'overespressione della catalasi nelle cellule muscolari lisce blocca la fosforilazione delle Erk indotta dal PDGF-R, come anche la sintesi di DNA e la migrazione (Sundaresan M et al., 1995); un blocco della produzione di ROS nelle cellule stimulate con PDGF, mediante pre-trattamento con catalasi, o inibizione della NADPH ossidasi con difenil-ioduro, provoca una riduzione della fosforilazione del PDGF-R (Chiarugi P et al., 2002).

In seguito alla riduzione dei livelli di ROS, le PTP recuperano la loro attività catalitica e defosforilano il recettore, portando così a termine la segnalazione.

Le PTP possono legarsi ai residui di fosfotirosina del recettore tramite i domini SH2 o con un'interazione transiente del tipo enzima-substrato. Diverse PTP, quali PTP-PEST, SHP-2, PTP-1B, T-cell PTP, sono in grado di legare il PDGF-R (Markova B et al., 2003), fra queste la SHP-2 è la fosfatasi che lega più efficientemente il recettore, defosforilare il recettore e alcuni dei suoi substrati, portando a termine la segnalazione. Anche le LMW-PTP (*low molecular weight PTP*) regolano l'attività PDGF-R, defosforilando la Tyr857; il legame della LMW-PTP regola negativamente molte molecole segnale attivate dal PDGF, come la PI3K, SHP-2 e PLC- $\gamma$ , ma non le MAPK (Chiarugi P et al., 1998).

Un altro meccanismo di modulazione della segnalazione del PDGF-R coinvolge l'endocitosi, che ha regola la quantità di recettore presente sulla membrana cellulare. Trascorso un certo tempo dall'attivazione, il recettore complessato con il ligando viene reclutato all'interno di vescicole rivestite da clatrina ed entra nel compartimento degli endosomi precoci; i recettori all'interno delle vescicole possono essere riciclati sulla membrana cellulare, oppure entrare nel compartimento degli endosomi tardivi e andare incontro a degradazione. Oltre alla degradazione lisosomiale, il recettore può essere degradato anche nel proteasoma in seguito ad ubiquitinazione (Mori S et al., 1995). Il processo di internalizzazione del PDGF-R è regolato dall'attività cinasica del recettore stesso, sembra siano di particolare importanza la fosforilazione della Tyr579 nel dominio iuxtamembrana (Mori S et al., 1994) e delle tirosine nel dominio di legame della PI3K (Joly M, 1994). L'internalizzazione del recettore sembra avere anche altri scopi oltre alla *down-regulation*, infatti diversi lavori provano come il recettore all'interno degli endosomi sia ancora attivo e in grado di segnalare (Sorkin A et al., 1993).

Oltre alla regolazione sul PDGF-R stesso, la segnalazione è finemente regolata a livello delle singole vie, soprattutto attraverso meccanismi di regolazione a feedback. Un esempio è nella cascata delle MAPK: il fattore Sos attiva la proteina Ras, questa induce l'attivazione di varie cinasi che terminano con l'attivazione delle MAPK; le MAPK fosforilano vari substrati, fra i quali la proteina Sos, che diventa inattiva e incapace di attivare Ras, regolando a monte la via di segnalazione (Porfiri E et al., 1996). Un altro meccanismo di feedback coinvolge la protein-cinasi c-AMP dipendente, il PDGF attiva questa cinasi tramite la sintesi di prostaglandine e l'attivazione dell'adenilato ciclasi, la cinasi c-AMP dipendente a sua volta fosforila e inibisce alcuni componenti delle vie di segnalazione attivate dal PDGF-R (Bornfeldt KE et al., 1997).

## LE RISPOSTE CELLULARI INNESCATE DAL PDGF-R

La fosforilazione del PDGF-R e l'attivazione delle diverse vie di segnalazione induce una serie di risposte cellulari, fra cui la sopravvivenza, la proliferazione e la migrazione (*fig.11*). Nessuna delle vie di segnalazione discusse precedentemente è coinvolta unicamente in un processo cellulare, anzi le molecole segnale e le diverse vie interagiscono fra loro dando luogo ai diversi effetti cellulari.

### Migrazione cellulare

La migrazione cellulare è un processo complesso che comporta la rottura dei contatti di una cellula con le altre cellule e con la matrice extracellulare, la formazione di lamellipodi, l'instaurarsi di nuovi contatti con l'ambiente e la contrazione dei filamenti di actina. Si può distinguere nel movimento cellulare un movimento diretto della cellula dal movimento casuale ameboide.

Il punto chiave per la migrazione cellulare è la formazione di strutture di adesione focale, nelle quali sono coinvolte diverse molecole, fra le quali l'integrina  $\beta_1$  e la cinasi FAK: esperimenti su cellule di topo hanno dimostrato che l'inattivazione dei geni codificanti per tali proteine determina una minor mobilità cellulare (Hirsch E et al., 1996; Ilic D et al., 1995).

La stimolazione con PDGF media vari tipi di movimento cellulare, ad esempio il PDGF-BB causa chemiotassi nelle cellule muscolari lisce vascolari, inoltre è stato osservato che l'FGF-2 incrementa la chemiotassi indotta da PDGF-BB nelle cellule muscolari lisce, in un processo che coinvolge l'up-regolazione delle integrine  $\alpha_2\beta_1$  (Pickering JG et al., 1997). A il PDGF induce l'attivazione della tirosino-cinasi FAK soprattutto a basse concentrazioni (Rankin S et al., 1994), inoltre attiva la PI3K, che a sua volta attiva diversi membri delle G proteine della famiglia di Rho, coinvolte in varie risposte di movimento, come la chemiotassi e la riorganizzazione delle fibre di actina. I membri di questa famiglia esercitano effetti diversi sulla riorganizzazione dell'actina: Rho è importante per la formazione di fibre di stress, Cdc42 per la formazione di filipodi, Rac per il fenomeno del *ruffling*; inoltre Rac è importante anche per la chemiotassi (Hooshmand-Rad R et al., 1997). Altri effettori della PI3K coinvolti nel movimento cellulare sono membri della famiglia di PKC, attivati direttamente dal  $PI(3,4,5)P_3$ .

Anche la PLC- $\gamma$  ha un ruolo nel mediare il segnale chemiotattico del recettore  $\beta$  del PDGF, come dimostrato da esperimenti di Hansen et al., nei quali il recettore era mutato su Tyr<sup>934</sup>, un sito di fosforilazione di Src; questo recettore mutato induce la fosforilazione e l'attivazione della PLC- $\gamma$  molto più efficientemente del recettore *wild-type* e media una risposta chemiotattica molto più potente (Hansen K, 1996).

E' stato dimostrato che l'attivazione di Ras induce la riorganizzazione dell'actina (Bar-Sagi D et al., 1986), ma sembra che questo effetto sia indiretto e mediato dall'attivazione della PI3K (Rodriguez-Viciano P et al, 1997). E' possibile inoltre che il ruolo di Ras nella chemiotassi non sia mediato dall'attivazione della cascata delle MAPK, infatti l'overespressione di un dominante negativo di MEK non influenza la chemiotassi indotta da PDGF (Anad-Apte B et al., 1997). Probabilmente è coinvolta invece l'attivazione da parte di Ras della PI3K. Ci sono comunque altre osservazioni a favore di un ruolo delle MAPK nella chemiotassi in alcuni tipi cellulari (Graf K et al., 1997).

A differenza del recettore  $\beta$ , il recettore  $\alpha$  in alcuni tipi di cellule può indurre un'inibizione della chemiotassi (Koyama N et al., 1992).

### **Proliferazione cellulare**

Uno degli effetti principali della stimolazione con PDGF è l'induzione alla proliferazione cellulare, questa risposta coinvolge in gran parte l'attivazione della via delle MAPK (Seger R et al., 1995).

L'attivazione di Ras è il principale meccanismo di attivazione della cascata delle MAPK, questa proteina è perciò di grande importanza per la stimolazione alla crescita. L'attivazione di Ras da parte del PDGF-R  $\beta$  può avvenire tramite interazione diretta di Grb2/Sos con la Tyr<sup>716</sup> fosforilata del recettore o tramite il legame di Grb2/Sos a molecole fosforilate che a loro volta legano il recettore, come Shc o SHP-2. L'attivazione di Ras da parte del PDGF-R  $\beta$  è strettamente controllata, infatti insieme all'attivazione diretta o indiretta di Grb2/Sos si ha parallelamente il legame di GAP al recettore, che inattiva Ras; perciò l'attivazione netta di Ras è determinata dall'equilibrio fra segnali di attivazione e di inattivazione.

Ci sono anche casi di attivazione della MAPK indipendenti da Ras, ad esempio la sfingosina-1-fosfato, che si forma in seguito ad attivazione del PDGF-R. La sfingosina-1-fosfato ha effetto prevalentemente sulla chemiotassi e sulla riorganizzazione dell'actina nelle cellule muscolari lisce, ma è coinvolta anche nella

stimolazione alla crescita nella cellule Swiss 3T3 e nelle cellule muscolari lisce delle vie respiratorie (Olivera A et al., 1993; Pyne S et al., 1996).

Un altro meccanismo di attivazione della cascata delle MAPK indipendente da Ras è l'attivazione indotta da PDGF della PLC fosfatidilcolina-specifica; il DAG rilasciato in seguito all'azione di tale enzima attiva una PKC- $\zeta$  che a sua volta attiva Raf-1.

Tramite microiniezioni in cellule NIH3T3 di anticorpi diretti verso le diverse molecole segnale, Roche et al. scoprirono tutte le molecole coinvolte nella crescita cellulare indotta da PDGF, fra le quali PLC- $\gamma$ , SHP-2, Shc e Nck (Roche S, 1996). Con esperimenti simili è stata dimostrata anche l'importanza di Src e della PI3K nella crescita indotta da PDGF (Twamley-Stein GM et al., 1993; Hu Q et al., 1995).

### **Anti-apoptosi**

Il PDGF stimola le cellule a proliferare, ma fa anche in modo che esse non vadano incontro a morte cellulare.

Sembra che in questo effetto sia di fondamentale importanza la PI3K. Nella via di segnalazione anti-apoptotica della PI3K una molecola effettrice importante è la serina-treonina cinasi Akt (Dudek H et al., 1997). L'attivazione di Akt infatti porta a fosforilazione del membro Bad della famiglia Bcl-2, e sopprime in questo modo il suo effetto apoptotico (Datta SR, 1997). Infatti Bad nella forma defosforilata interagisce con il membro Bcl<sub>XL</sub> della famiglia Bcl e induce l'apoptosi.

Anche Ras è coinvolto nell'effetto anti-apoptotico, per la sua capacità di attivare la PI3K, ma in alcuni casi Ras può agire invece attraverso la via Raf/MAPK e favorire l'apoptosi (Downward J, 1998).

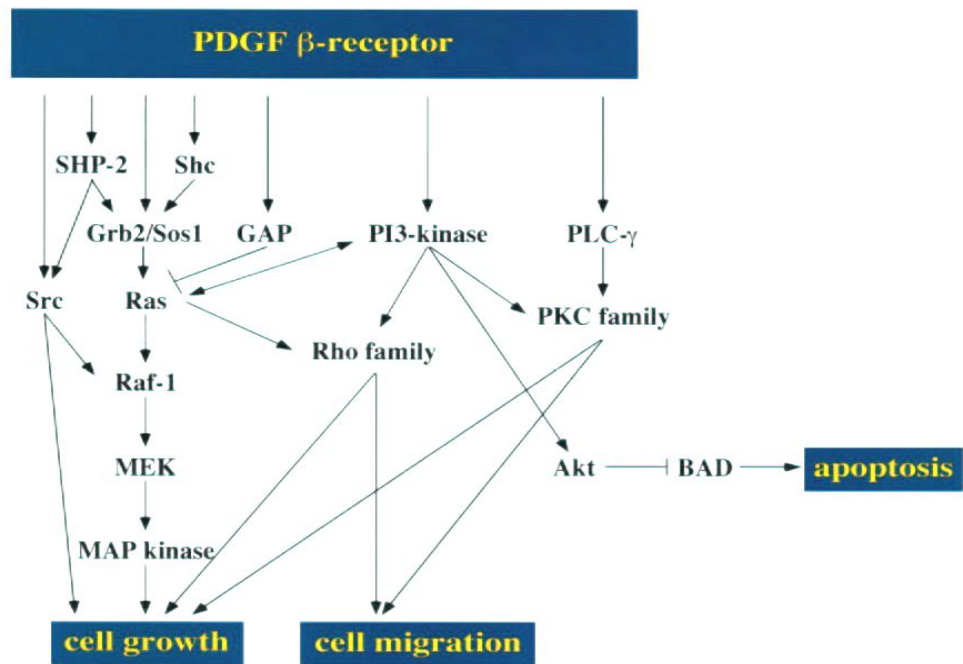


Figura 11. Il PDGF è coinvolto nella regolazione del movimento cellulare, della proliferazione dell'inibizione dell'apoptosi.

## **RUOLO FISIOLÓGICO E PATOLOGICO DEL PDGF**

### **Sviluppo embrionale**

Il PDGF e il suo recettore hanno un ruolo importante nello sviluppo embrionale: mutanti *knock-out* per il gene del PDGF B, PDGF-R  $\alpha$  o PDGF-R  $\beta$  sono letali allo stadio embrionale, mentre i mutanti per il gene del PDGF A sono comunque letali, ma nelle fasi dello sviluppo. I mutanti *knock-out* per il gene del PDGF C sono oggi in fase di studio, mentre il gene del PDGF D non è ancora stato analizzato.

L'assenza di espressione della catena B o del recettore  $\beta$  compromettono seriamente lo sviluppo del fegato e causano la totale assenza di sviluppo delle cellule mesangiali, il che comporta una scarsa filtrazione glomerulare. Si ha anche un alterato sviluppo dei vasi sanguigni, con un'aorta dilatata e sanguinamenti al momento della nascita, dovuti presumibilmente all'incapacità dei vasi neo-formati di attrarre i periciti (Lindahl P et al., 1997). I topi *knock-out* per la catena B mostrano anche difetti al cuore, che si presenta di aumentate dimensioni e con trabecolazioni.

L'assenza del gene per la catena A porta invece a difetti nello sviluppo degli alveoli polmonari, con un fenotipo simile a quello dell'enfisema, causata da un mancato allungamento delle cellule muscolari lisce durante lo sviluppo dei polmoni (Lindahl P et al, 1997).

L'inattivazione del recettore  $\alpha$  porta invece ad un fenotipo più compromesso, con malformazioni craniali e alterazioni nella formazione del miotomo (Soriano P, 1997). Sono stati condotti studi sull'espressione delle catene A e B del PDGF e sui recettori: nelle diverse fasi dello sviluppo è stata osservata l'espressione del recettore e del ligando nella stessa cellula, probabilmente con un funzione di stimolazione autocrina, oppure l'espressione di ligando e recettore in cellule vicine, indicando una modalità di funzionamento paracrina (Ataliotis P et al., 1997).

In fasi più avanzate dello sviluppo embrionale i vari tipi di PDGF-R sono espressi spesso nelle cellule mesenchimali, e i rispettivi ligandi nelle vicine cellule epiteliali.

Le due isoforme del PDGF-R sono espresse anche in cellule di origine non mesodermica, come le creste neurali, di derivazione ectodermica, le cellule dell'epitelio mammario, le cellule epiteliali pigmentate della retina e nel sistema nervoso centrale (Orr-Urteger A et al., 1992; Schatteman GC et al., 1992; Ho L et al., 1994).

### **Sistema vascolare**

I recettori del PDGF sono espressi sulle cellule endoteliali dei capillari e il PDGF ha un effetto angiogenico (Bar RS et al., 1989; Beitz JG, 1991), non tanto nello sviluppo iniziale dei vasi sanguigni, quanto nella corretta strutturazione dei vasi neoformati.

Il PDGF B/PDGF-R  $\beta$  promuovono la proliferazione dei progenitori delle cellule murali e dei periciti durante la formazione di nuovi vasi nello sviluppo embrionale; il PDGF-R  $\beta$  è espresso sulle cellule murali e sui periciti che circondano i vasi, il PDGF B nell'endotelio (Hellstrom M et al., 1999).

In topi mutanti per il gene del PDGF B o del PDGF-R  $\beta$ , si ha la formazione di un'iniziale rete vascolare, che rende possibile lo sviluppo embrionale, ma poco prima della nascita si formano micro-aneurismi ed emorragie nel cervello (Hellstrom M et al., 2001); altre alterazioni sono visibili sulla pelle, che diventa edematosa, nel cuore e nella placenta. I sanguinamenti sono dovuti all'assenza di periciti, che normalmente esercitano un effetto locale sui vasi, regolandone il diametro e la funzionalità (Bjarnegard M et al., 2004). I periciti regolano il numero di cellule endoteliali, la differenziazione cellulare e la funzionalità dell'endotelio, infatti la loro mancanza comporta iperplasia endoteliale e varie alterazioni ultrastrutturali. Capillari privi di periciti nei mutanti per il PDGF B o PDGF-R  $\beta$  mostrano vasi con diametro molto irregolare e questo può favorire un incremento delle resistenze periferiche e una ridotta perfusione.

La zona in cui si ha la maggior densità di periciti è la retina, topi mutanti per il gene del PDGF B o del PDGF-R  $\beta$  mostrano una ridotta quantità di periciti della retina e sviluppano gravi retinopatie (Enge M et al., 2002).

Il rene e la placenta sono altri due organi colpiti dall'assenza di periciti. I periciti normalmente costituiscono il 30% delle cellule del glomerulo renale (cellule mesangiali), mentre nei topi mutanti per PDGF B o PDGF-R  $\beta$  mancano quasi completamente le cellule mesangiali (Leveen P et al., 1994; Soriano P, 1994); la mancanza di queste cellule porta alla formazione di un glomerulo che non ha una rete di capillari, ma solo un singolo vaso dilatato.

Nella placenta i periciti formano un asse centrale intorno a cui si organizzano le reti capillari; nei mutanti per PDGF B o PDGF-R  $\beta$  la ridotta densità di periciti nella placenta comporta la riduzione del numero di vasi e le loro aumentate dimensioni (Ohlsson R et al., 1999).

Il PDGF è coinvolto anche nella regolazione del tono vascolare: da un lato induce la costrizione dei vasi sanguigni (Berk BC et al., 1986), dall'altro la stimolazione delle cellule endoteliali con PDGF BB induce rilascio di ossido nitrico e media il rilassamento dell'aorta (Cunningham LD et al., 1992).

Un altro importante effetto del PDGF nel sistema vascolare è il controllo sull'aggregazione piastrinica (Bryckaert MC et al., 1989): in seguito ad aggregazione piastrinica indotta da trombina, viene rilasciato il contenuto dei granuli  $\alpha$ , incluso il PDGF, che agisce sui recettori  $\alpha$  delle piastrine ed esercita un ruolo di *feedback* autocrino sul controllo dell'aggregazione.

### **Interazioni epitelio-mesenchima**

Vari organi mostrano un'espressione simile del PDGF che indica una sua funzione paracrina. Nel polmone, nell'intestino e nell'epidermide il PDGF A è espresso dall'epitelio in modo transiente e/o ristretto spazialmente, mentre il PDGF-R  $\alpha$  è espresso da una popolazione adiacente di cellule mesenchimali.

I *knock-out* per il PDGF A che sopravvivono fino alla nascita presentano una mancata formazione del setto alveolare (Bostrom H et al., 1996) e un fenotipo simile si ha anche nei mutanti del PDGF-R  $\alpha$  (Klinghoffer RA et al., 2002; Sun T et al., 2000). Questo fenotipo è dovuto alla scarsità di cellule muscolari lisce e di depositi di elastina (Lindahl P et al., 1997) e probabilmente è causato dalla mancata espansione e allungamento dei progenitori delle cellule muscolari lisce, che normalmente esprimono il PDGF-R  $\alpha$ .

A livello intestinale i *knock-out* del PDGF A presentano villi ridotti in numero, anomali in lunghezza e spessore (Karlsson L et al., 2000). Durante lo sviluppo, il PDGF A è espresso inizialmente nell'epitelio intestinale e il PDGF-R  $\alpha$  nelle cellule mesenchimali proliferative adiacenti all'epitelio; con la formazione del villo le cellule mesenchimali formano inizialmente un cluster di cellule non proliferative, associate alla cima del villo, poi si distribuiscono in un singolo strato cellulare lungo la membrana basale del villo. Una volta formati i primi villi, cominciano a formarsene di nuovi tra questi e l'espressione del PDGF A si concentra sull'epitelio della cripta. Nei mutanti per PDGF A, il primo cluster di cellule esprimenti PDGF-R  $\alpha$  si forma normalmente, ma i cluster seguenti sono piccoli o mancano completamente, probabilmente a causa del progressivo esaurimento dei progenitori di queste cellule (Karlsson L et al., 2000): il ruolo del PDGF A nell'intestino sembra

essere perciò quello di assicurare il rinnovamento delle cellule esprimenti PDGF-R  $\alpha$ , in assenza di PDGF A questa popolazione cellulare si esaurisce con il primo ciclo di formazione dei villi. I mutanti per PDGF-R  $\alpha$  presentano alterazioni più gravi e più precoci nella formazione dei villi rispetto ai mutanti per PDGF A; probabilmente qualche altro ligando del PDGF-R  $\alpha$ , ad esempio il PDGF C, può svolgere lo stesso ruolo del PDGF A nello sviluppo intestinale (Ding H et al., 2000; Aase K et al., 2002).

I mutanti per PDGF A presentano inoltre derma sottile e alterazioni del bulbo pilifero (Karlsson L et al., 1999). Durante lo sviluppo, il PDGF A è espresso dall'epidermide e il PDGF-R  $\alpha$  dalle adiacenti cellule mesenchimali; quando si forma il bulbo pilifero l'espressione del PDGF A si localizza nella parte in crescita del follicolo, mentre il PDGF-R  $\alpha$  è espresso dalle cellule mesenchimali che rivestono il follicolo e dalla papilla dermica. Nei mutanti per PDGF A si esauriscono progressivamente tre tipi cellulari del derma esprimenti PDGF-R  $\alpha$ : le cellule della papilla dermica, le cellule di rivestimento del follicolo, i fibroblasti; probabilmente tutte queste cellule derivano da cellule esprimenti PDGF-R  $\alpha$ , che sono stimulate inizialmente dal PDGF A prodotto dall'epidermide.

### **Sistema Nervoso Centrale**

Il PDGF B è stato trovato in neuroni di diverse regioni del SNC, sia nell'adulto che nell'embrione (Sasahara A et al., 1991); la maggior espressione si ha nel sistema olfattivo, dove il PDGF B è presente nelle fibre nervose olfattive e nelle fibre accessorie, nell'adulto ha probabilmente funzione di fattore neurotrofico.

Prima che fossero possibili studi su topi mutati geneticamente, erano stati fatti studi *in vitro* che suggerivano un ruolo del PDGF A come mitogeno per i progenitori degli oligodendrociti (Noble M et al., 1988; Richardson WD et al., 1988). Altri dati *in vivo* sostengono un ruolo critico del PDGF nello sviluppo delle cellule mielinate nel SNC: infatti, un'iperproduzione di PDGF nel SNC del topo porta a un'espansione del compartimento degli oligodendrociti, dovuto ad un ridotto tasso di apoptosi (Barres BA et al., 1992). Topi mutanti con inattivazione del PDGF A e del PDGF-R  $\alpha$  sviluppano tremori dovuti all'ipometilazione delle fibre nervose nel SNC (Fruttiger M et al., 1999, Klinghoffer RA et al., 2002).

Gli oligodendrociti derivano dalle cellule esprimenti PDGF-R  $\alpha$  della zona periventricolare e si differenziano dopo la nascita; la loro proliferazione e

l'allungamento sono fortemente dipendenti dal PDGF A, espresso da neuroni e astrociti in tutto il SNC (Pringle NP et al, 1993). Nei topi mutanti si ha una grave deficienza di mielina nelle zone più lontane dal sito di induzione delle cellule progenitrici; un esempio è il nervo ottico, nel quale la densità di fibre mieliniche diminuisce progressivamente dal chiasma ottico verso la retina (Fruttiger M et al., 1999).

Nella retina (dove sono assenti gli oligodendrociti) il numero di astrociti sembra essere regolato dal PDGF A; qui le cellule gangliari esprimono il PDGF A mentre il PDGF-R  $\alpha$  è espresso dagli astrociti della retina (Fruttiger M et al., 1996). I mutanti per PDGF A mostrano una riduzione nel numero di astrociti della retina di circa il 50%.

### **Cicatrizzazione delle ferite**

La cicatrizzazione dei tessuti molli comporta la ri-epitelizzazione, l'angiogenesi e la deposizione di matrice extracellulare; fra i diversi fattori di crescita che regolano i passaggi di questo processo c'è anche il PDGF.

Il PDGF agisce su diverse cellule coinvolte nella cicatrizzazione: stimola la mitogenesi e la chemiotassi dei fibroblasti e delle cellule muscolari lisce e la chemiotassi di neutrofili e macrofagi; stimola anche i macrofagi a produrre e secernere altri fattori di crescita importanti per altre fasi del processo, inoltre stimola la produzione di molecole della matrice, come fibronectina, collagene, proteoglicani e acido ialuronico (Blatti SP et al., 1988; Canalis E, 1981; Heldin P et al., 1989; Schonherr E et al., 1991). I primi studi dimostrarono che il PDGF viene rilasciato dalle piastrine e secreto dai macrofagi attivati, dalle cellule endoteliali stimolate da trombina, da cellule muscolari lisce dei vasi danneggiati, dai fibroblasti attivati e dai cheratinociti dell'epidermide (Shimokado K et al., 1985; Harlan JM et al., 1986, Paulsson Y et al., 1987; Ansel JC et al., 1993).

Le cellule nell'area della ferita aumentano l'espressione del PDGF-R, ad esempio, i fibroblasti e le cellule muscolari lisce presentano normalmente bassi livelli di recettore, ma il recettore  $\beta$  può essere up-regolato durante un'inflammazione (Reuter Dahl C et al., 1993).

L'applicazione locale di PDGF aumenta la cicatrizzazione di vari tipi di ferite (Pierce GF et al., 1988): le ferite trattate con PDGF mostrano un maggior tasso di ri-epitelizzazione e neovascolarizzazione e un aumento di tessuto di granulazione ricco

in fibroblasti e glucosamminoglicani,. Il PDGF quindi non altera la sequenza del processo di riparazione, ma lo accelera (Mustoe TA et al., 1991; Pierce GF et al., 1991). Il PDGF BB accelera anche la cicatrizzazione delle ulcere da decubito (Robson MC et al., 1992), stimolando la proliferazione e la differenziazione dei fibroblasti (Pierce GF et al., 1994); il PDGF BB aumenta la cicatrizzazione anche in pazienti con ridotte capacità riparative, come i diabetici (Steed DL, 1995).

Un'iperproduzione di PDGF può anche essere coinvolta nell'eccessiva risposta di cicatrizzazione dei cheloidi, infatti i fibroblasti dei cheloidi hanno una quantità di PDGF-R cinque volte maggiore di quella dei fibroblasti della pelle normale (Haisa M et al., 1994).

### **Aterosclerosi**

Il PDGF è espresso a bassi livelli nelle arterie degli adulti sani, ma la sua espressione è notevolmente aumentata nelle risposte infiammatorie-fibroproliferative che caratterizzano l'aterosclerosi (Libby P et al., 1989; Rubin K et al., 1988; Wilcox JN et al., 1988). L'aumentata produzione di PDGF e di PDGF-R può essere causata da stimoli esterni, ma anche da cambiamenti reologici, infatti il flusso sanguigno lento porta ad un'aumentata produzione di PDGF da parte delle cellule endoteliali (Mondy GS et al., 1997).

Il ruolo del PDGF nella lesione aterosclerotica potrebbe essere quello di stimolare le cellule muscolari lisce a migrare dalla media all'intima dell'endotelio, a proliferare e produrre molecole della matrice (Pompili VJ et al., 1995).

L'ipercolesterolemia rappresenta una delle cause più frequenti di aterosclerosi; il PDGF sembra essere coinvolto nell'aterosclerosi indotta da colesterolo, infatti nelle cellule mononucleate di soggetti con ipercolesterolemia si hanno livelli più elevati di PDGF A e B (Billett MA et al., 1996).

### **Fibrosi**

Un'overespressione del PDGF sembra essere coinvolta nello sviluppo di diverse condizioni fibrotiche del polmone (Souza P et al., 1996), ad esempio nella fibrosi polmonare idiopatica si ha un'iperproduzione di PDGF da parte dei macrofagi dell'alveolo e dell'epitelio polmonare (Vignaud JM et al., 1991; Antoniadis HN et al., 1990); anche in varie altre forme di fibrosi polmonare, causate da bronchiti o polmoniti, è stata rilevata un'aumentata espressione di PDGF.

Il PDGF ha un ruolo anche nella patogenesi della sindrome di Hermansky-Pudlak, una forma genetica di fibrosi polmonare; nel fluido bronchiale di pazienti affetti da questa sindrome è presente un'alta concentrazione di PDGF prima ancora che essi presentino alcun sintomo (Harmon KR et al., 1994).

L'eccessiva quantità di PDGF è coinvolta anche nella patogenesi di diverse malattie renali caratterizzate da un'iperproliferazione di cellule mesangiali, fra cui la nefropatia ad IgA, le glomerulonefriti membrano-proliferative, la nefrite da lupus (Abboud HE, 1995), la fibrosi tubulo-interstiziale (Tang WW et al., 1996).

Il PDGF è implicato anche nella cirrosi epatica, in questa condizione patologica le cellule adipose (cellule di Ito) si de-differenziano in cellule simili a miofibroblasti, che rispondono alla stimolazione con PDGF (Heldin P et al., 1991). Dopo una lesione al fegato, come la somministrazione di tetracloruro di carbonio, la quantità di PDGF e PDGF-R nel fegato aumentano (Wong L et al., 1999); il PDGF è presente nelle cellule dell'infiltrato flogistico e lungo le strutture vascolari dei setti fibrosi, il PDGF-R si trova invece nelle cellule mesenchimali e nei setti fibrosi e la sua espressione varia con la gravità della lesione (Pinzani M et al., 1996).

### **Oncogenesi**

La segnalazione autocrina del PDGF-R può rappresentare un meccanismo di trasformazione cellulare, la prima dimostrazione di questo venne dalla scoperta che v-Sis, il prodotto dell'oncogene del virus del sarcoma delle scimmie (SVV), è identico al precursore della catena B del PDGF (Doolittle RF et al., 1983; Waterfield MD et al., 1983). In seguito fu dimostrata la capacità trasformante del c-DNA umano del gene del PDGF B (Clarke MF et al., 1984); altri studi hanno dimostrato che anche l'espressione del PDGF AA, CC o DD nei fibroblasti NIH3T3 possono portare a trasformazione cellulare (Beckmann MP et al., 1988; Li H et al., 2003).

In cellule trasfettate con il gene v-sis il PDGF appena sintetizzato si lega ai recettori immaturi già nel reticolo endoplasmatico, dove causa l'autofosforilazione del PDGF-R  $\beta$  (Keating MT et al., 1988); molti ricercatori credono che il segnale mitogenico e trasformante sia generato intracellularmente (Bejcek BE et al., 1989; Keating MT et al., 1988), altri pensano invece che il segnale trasformante sia generato solo dai recettori presenti in superficie (Fleming TP et al., 1989; Hannink M et al., 1988).

Il gene sis causa tumori anche in animali da esperimento: ad esempio il virus SSV causa nelle scimmie fibrosarcoma, se iniettato nel muscolo, o glioma, se iniettato nel

cervello. Un vettore del PDGF B causa fibrosarcoma e glioma nel topo (Pech M et al., 1989; Uhrbom L et al., 1998).

Molti scienziati hanno studiato l'espressione del PDGF e del suo recettore in vari tipi di neoplasie umane, e adesso sappiamo che molte esprimono questo fattore di crescita o il suo recettore, con funzione di stimolazione autocrina per le cellule tumorali. Il coinvolgimento del PDGF nella carcinogenesi è stato confermato con la scoperta di alterazioni strutturali del gene del PDGF e del PDGF-R, che portano ad overespressione o ad espressione di una proteina mutata.

Il *dermatofibrosarcoma protuberans* (DFSP) e il fibrosarcoma a cellule giganti (GCF) rappresentano rare neoplasie del derma, sono caratterizzate da una traslocazione specifica dei cromosomi 17/22, che porta alla formazione di un nuovo gene codificante una proteina di fusione. Questa risulta composta da una porzione amminoterminale derivata dal collagene 1A1 (COL1A1) e da una porzione carbossiterminale corrispondente al PDGF B (Simon MP et al., 1997). Nel processamento di questa proteina di fusione, la parte di COL1A1 viene tagliata e la proteina matura risulta identica al PDGF BB. Il meccanismo trasformante associato a questa traslocazione è imputabile ad un'eccessiva produzione di PDGF BB, dovuta al promotore molto attivo di COL1A1 (Shimizu A et al., 1999; Greco A et al., 1998).

I tumori gastrointestinali stromali (GIST) sono tumori del tratto gastrointestinale che colpiscono soprattutto lo stomaco; i GIST derivano dalle cellule interstiziali di Cajal e in più dell'80% dei casi presentano una mutazione del gene c-kit (Kindblom LG et al., 1998). I tumori che invece conservano la forma nativa di c-kit presentano spesso una mutazione intragenica del PDGF-R  $\alpha$  (Heinrich MC et al., 2003); possono essere mutazioni puntiformi o piccole delezioni, in tutti i casi il recettore mutato è fosforilato e attiva le vie di segnalazione indipendentemente dalla presenza del ligando (Hirota S et al., 2003).

Le leucemie mieloidi croniche Bcr-Abl-negative costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie, in un sottogruppo si ha un'attivazione dell'espressione del PDGF-R  $\beta$  tramite traslocazione (Steer EJ et al., 2002). La prima traslocazione è stata caratterizzata in un paziente con leucemia cronica mielomonocitaria, ed è stata identificata una proteina trasformante, in cui il dominio extracellulare del PDGF-R  $\beta$  è rimpiazzato dal dominio di dimerizzazione del fattore di trascrizione Tel/ETV6 (Golub TR et al., 1994) e il dominio tirosino-cinasico risulta costitutivamente attivo

(Carroll M et al., 1996). Dopo l'iniziale caratterizzazione di Tel/ETV6, sono state descritte altre proteine che possono formare la proteina di fusione con il PDGF-R  $\beta$ . La sindrome ipereosinofila idiopatica (HES) comprende un vasto gruppo di malattie ematologiche, caratterizzate da una persistente eosinofilia; in un sottogruppo di queste malattie è stata scoperta una proteina di fusione del PDGF-R  $\alpha$ , generata da una delezione interna del cromosoma 4 (Cools J et al., 2003), la proteina di fusione che ne deriva è generata dalla fusione tra l'esone 8, 9 o 10 di FIP1L1 (*Factor interacting with PAPI-like1*) e l'esone 12 del PDGF-R  $\alpha$ , e risulta costitutivamente attiva.

I gliomi sono i tumori più frequenti del sistema nervoso centrale, e fra questi il glioblastoma multiforme (GMB) rappresenta la forma più aggressiva. Si distinguono i GMB primari, caratterizzati dall'amplificazione del gene EGF-R e mutazioni di PTEN, e i GMB secondari, con un'attivazione autocrina del PDGF-R e mutazioni in p53 (Maher EA et al., 2001). La co-espressione di PDGF e PDGF-R  $\alpha$  è comune nei GMB e spesso associata alla perdita di funzione di p53 (Hermanson M et al., 1992, Hermanson M et al., 1996); nella maggior parte di questi tumori il gene del PDGF-R  $\alpha$  non è mutato, ma in alcuni casi risulta amplificato (Fleming TP et al., 1992).

Il PDGF è un potente mitogeno e chemioattrattante per fibroblasti e miofibroblasti, analisi di sezioni istologiche tumorali hanno dimostrato l'espressione del PDGF o del PDGF-R anche in vari tipi di tumori dei tessuti molli (Smits A et al., 1992; Wang J et al., 1994).

## IL RUOLO DELL'ENDOCITOSI NELLA BIOLOGIA CELLULARE DEGLI RTK

Gli RTKs, una volta attivati, dopo un certo tempo vengono internalizzati e trasferiti in compartimenti intracellulari; l'endocitosi ligando-indotta è stata considerata per lungo tempo un meccanismo destinato esclusivamente alla degradazione del recettore e quindi alla terminazione della segnalazione.

Recenti studi hanno dimostrato come i recettori all'interno degli endosomi rimangono attivi e quindi che l'endocitosi potrebbe avere un ruolo fondamentale nella regolazione della segnalazione cellulare.

La funzione più evidente dell'endocitosi è quella di rimuovere i complessi ligando-recettore dalla membrana, per permettere alla cellula di ricevere ulteriori segnali, ma l'internalizzazione degli RTK è un processo molto complesso e strettamente regolato, che ha più di un ruolo nella segnalazione. L'endocitosi potrebbe avere due funzioni nella regolazione del segnale: controllare l'intensità e la specificità della risposta.

Inizialmente l'endocitosi è stata scoperta per il recettore dell'EGF, il quale, in seguito ad interazione con il ligando, va incontro a rapida internalizzazione, con un meccanismo che richiede l'attività cinasica intrinseca del recettore e specifici motivi nel dominio C-terminale di questo. Il recettore complessato con il ligando viene reclutato all'interno di fossette rivestite da clatrina (CCPs, *clathrin-coated pits*) che poi si staccano dalla membrana cellulare formando vescicole rivestite da clatrina (CCVs, *clathrin-coated vesicles*). Le molecole di clatrina si auto-assemblano, formando una rete che crea un'invaginazione della membrana da cui si formano le CCP, interviene poi la GTPasi dinamina per promuovere il distacco delle vescicole dalla membrana. La dinamina è una proteina ad alto peso molecolare (100 KDA) con attività GTPasica, che gioca un ruolo chiave nella formazione delle vescicole rivestite da clatrina (Damke H et al., 1994; Hinshaw JE et al., 1995).

Si conoscono tre isoforme della dinamina: la dinamina 1 espressa nel cervello, la dinamina 2 ubiquitaria e la dinamina 3 presente nei testicoli (Liu J et al., 1995). Tutte e tre le isoforme hanno un dominio N-terminale GTPasico coinvolto nel legame e nell'idrolisi del GTP. Il dominio GTPasico è caratterizzato da un'elevata attività GTPasica basale e da una bassa affinità per il GTP; la regione centrale ha un dominio PH (*pleckstrin homology*) che lega specificamente il fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato; la regione C-terminale comprende una struttura elica-elicata (*coiled-coil*)

chiamata GED (*GTPasi effector domain*) che è coinvolta nella polimerizzazione e nell'auto-assemblaggio della dinamina; il GED è seguito dal dominio PRD (*proline-rich domain*) che interagisce con il dominio SH3 (*Src homology 3*), presente in molte proteine.

Secondo il modello più accreditato, l'attività GTPasica della dinamina è legata a cambiamenti conformazionali indotti dalla guanosina, che portano all'auto-assemblaggio della dinamina (Muhlberg AB et al., 1997; Kessels MM et al., 2001). La dinamina è associata alle fossette rivestite presenti nella membrana plasmatica nella forma legante il GDP, lo scambio GDP/GTP porta all'auto-assemblaggio della dinamina intorno al collo dell'invaginazione, formando un collare. La dinamina assemblata idrolizza il GTP e subisce i cambiamenti conformazionali necessari per la formazione delle vescicole. La dinamina legante GDP si disassembla e viene quindi riciclata (*fig.12*).

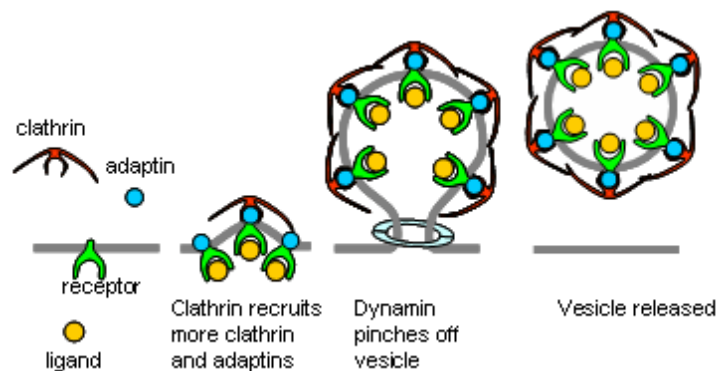


Figura 12. formazione delle vescicole rivestite da clatrina nel processo di endocitosi

Le proteine più abbondanti presenti nelle vescicole rivestite sono la clatrina e le proteine adattatrici come AP2, che si legano direttamente alla clatrina per dare inizio al processo di formazione delle vescicole, ma si legano anche al recettore e reclutano una serie di proteine regolatrici per l'endocitosi, portandole dal citoplasma in prossimità recettore. A questo punto il recettore entra nel cosiddetto compartimento degli endosomi "precoci" e questo passaggio sembra essere mediato da motivi Leu-Leu della regione iuxtamembrana del recettore.

Dopo l'internalizzazione negli endosomi precoci, i recettori possono andare incontro ad un processo di ricircolo ed essere riciclati sulla membrana, oppure sono indirizzati

agli endosomi multivescicolari per la degradazione (Marmor M et al., 2004; Katzmann DJ et al., 2002). Gli endosomi precoci e tardivi hanno diversa localizzazione subcellulare, infatti i precoci sono distribuiti più perifericamente, mentre i tardivi si trovano nella zona perinucleare; ci sono anche altre caratteristiche che li distinguono, gli endosomi tardivi appaiono spesso come corpi multivescicolari (MVBs, *multivesicular bodies*) con una membrana esterna che racchiude le vescicole interne, inoltre rispetto agli endosomi precoci i tardivi sono arricchiti di proteine specifiche e di acido liso-bifosfatidico. I recettori passano dalla membrana esterna alle vescicole interne degli MBV quando entrano nella via di degradazione (fig.13).

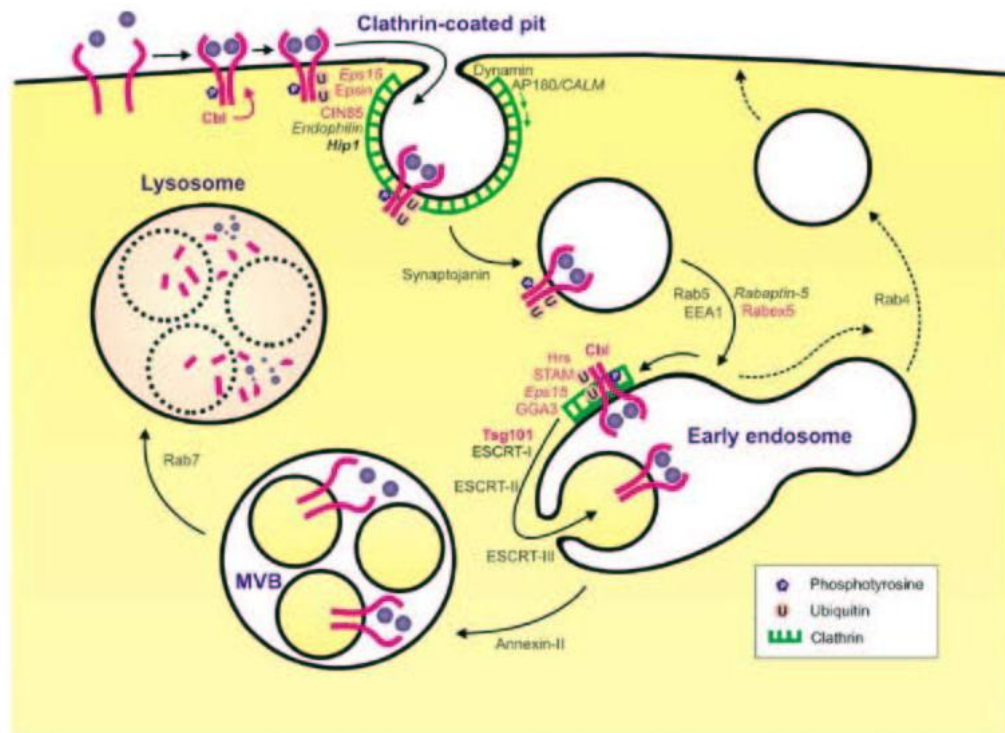


Figura 13. Processo di endocitosi, dalle vescicole rivestite di clatrina, alla formazione degli endosomi precoci e tardivi

L'internalizzazione degli RTKs è mediata da Cbl, una proteina che si lega al recettore attivato, promuove la multiubiquitinazione (de Melker AA et al., 2001) e quindi il passaggio negli MVB (Haglund K et al., 2003). Anche il recettore del PDGF e quello del CSF-1 sono controllati negativamente da Cbl; nel caso del recettore di CSF-1,

Cbl si associa al recettore direttamente sulla superficie cellulare, accelerando il processo di internalizzazione.

Gli EGF-R internalizzati hanno tutte le stesse caratteristiche dei recettori attivati sulla membrana: sono legati all'EGF, sono in forma dimerica, sono fosforilati in tirosina e interagiscono con proteine adattatrici contenenti domini SH2 e PTB, che collegano il recettore alle molecole effettrici. Ad esempio le proteine adattatrici Shc e Grb2 sono strettamente associate al recettore attivo sia quando si trova sulla superficie cellulare sia durante l'endocitosi portando all'attivazione di tutti i componenti della cascata delle MAPK (Di Guglielmo GM et al., 1994; Haugh J M et al., 1999; Kranenburg O et al., 1999).

Quindi la segnalazione dell'EGF non termina con l'internalizzazione, ma i recettori internalizzati continuano a segnalare finché non entrano nel compartimento degli endosomi tardivi, quando il recettore viene allontanato dalle sue molecole effettrici e il segnale è spento. Questo meccanismo potrebbe rappresentare un meccanismo per avere diverse modalità di regolazione spaziale e temporale della trasduzione del segnale, ma alcuni studi ipotizzano che dagli endosomi l'EGF-R possa attivare vie di segnalazione specifiche, diverse da quelle attivate dal recettore stesso in superficie (Vieira AV et al., 1996).

A lungo si è pensato che l'endocitosi clatrina dipendente o CME (*clathrin mediated endocytosis*) fosse la via principale coinvolta nell'internalizzazione dei recettori di membrana, come appunto l'EGF-R (Kirchhauesn T, 2002), ma successivi studi hanno dimostrato che molti recettori vengono endocitati attraverso una via clatrina indipendente. L'esistenza di questa via è stata dibattuta per lungo tempo e sono attualmente in corso studi per delucidare il meccanismo molecolare alla base di questo processo.

L'internalizzazione indipendente da clatrina è sensibile alla deplezione di colesterolo, questo dato ha portato all'idea che in questa via siano coinvolte particolari strutture della membrana chiamate lipid-raft ed è stata chiamata per questo RME (*lipid-raft mediated endocytosis*). Tale ipotesi è stata ulteriormente confermata dal fatto che molti componenti legati ai lipid-raft sembrano essere endocitati tramite vie non clatrina-mediate. Contrariamente all'endocitosi clatrina-mediate, non si conosce molto del meccanismo che regola la biogenesi delle vescicole in queste vie non

classiche. Comunque sembra che la caveolina, una proteina residente nei lipid-raft, abbia un ruolo importante almeno in alcune di queste vie.

L'endocitosi indipendente da clatrina può portare le molecole verso vari compartimenti intracellulari, inclusi l'apparato del Golgi e il reticolo endoplasmatico (Pelkmans L et al., 2001; Nichols BJ, 2001) e anche a compartimenti endocitotici.

Alcuni recettori sono internalizzati mediante CME, altri mediante RME, ma alcuni possono presentare entrambi i processi, e il significato di questo potrebbe essere che i due processi servano per scopi diversi. Ad esempio, il recettore del TGF- $\beta$  viene internalizzato tramite CME per il suo normale processo di ricircolo, nel quale continua a segnalare, mentre la frazione di recettori internalizzati mediante RME è quella destinata alla degradazione (Di Guglielmo GM et al., 2003).

Studi sull'EGF-R sostengono che quando il recettore è stimolato con basse concentrazioni di ligando viene internalizzato esclusivamente attraverso un meccanismo clatrina-dipendente, mentre a concentrazioni elevate entra in gioco anche una via clatrina-indipendente, definita in base alla sua sensibilità verso Filipina e Nistatina (sostanze che interferiscono con la formazione dei rafts). Sembra che le due vie CME e RME siano associate rispettivamente con la segnalazione e la degradazione del recettore (Sigismund S et al., 2005).

## L'IPOSSIA E HIF

Negli organismi superiori è necessario un costante apporto di ossigeno molecolare ( $O_2$ ), in quanto questo è utilizzato nella respirazione cellulare, come accettore terminale di elettroni per generare ATP nella fosforilazione ossidativa.

Le cellule possono rispondere in modo diverso ad un ampio range di valori di ossigeno, attraverso alterazioni dei loro stati metabolici e dei tassi di crescita.

Il termine ipossia definisce una carenza nel normale apporto di ossigeno alle cellule, che può essere causato da una riduzione dell'ossigeno presente nell'ambiente, come nel caso di un aumento di altitudine, oppure da un'ischemia localizzata causata dalla rottura di un vaso sanguigno.

I mammiferi hanno sviluppato diverse strategie per rispondere ad un ridotto apporto di ossigeno, come l'aumento della respirazione e la vasodilatazione; in generale le risposte all'ipossia sono mirate a stimolare la produzione di vasi sanguigni tramite eritropoiesi (Goldberg MA et al., 1988) e ad aumentare l'apporto di sangue nelle aree interessate tramite angiogenesi (Shweiki DA et al., 1992). A livello cellulare si ha un incremento di proteine come il VEGF (*vascular endothelial growth factor*), che induce la formazione di vasi sanguigni nelle zone ipossiche, di eritropoietina, che aumenta la produzione di sangue, e della ossido-nitrico sintasi inducibile, che stimola la vasodilatazione (Minchenko A et al., 1994; Goldberg MA et al., 1988; Palmer LA et al., 1998). Nelle cellule endoteliali, ad esempio, la bassa tensione di ossigeno influenza la fisiologia cellulare regolando l'espressione e il rilascio di sostanze vasoattive e di proteine della matrice coinvolte nella regolazione del tono vascolare e nel rimodellamento dei tessuti circostanti (Vender RL et al., 1987; Rakugi H et al., 1990).

Quando si trova in carenza di ossigeno la cellula mette in atto dei meccanismi volti a restaurare l'omeostasi, infatti in condizioni di ipossia molte reazioni biologiche mostrano differenze significative rispetto alla normossia: ad esempio si ha un incremento del tasso glicolitico e un rallentamento dei processi che consumano energia, come la proliferazione cellulare (Gordan J et al., 2007).

In carenza di ossigeno si ha una diminuzione della fosforilazione ossidativa a livello mitocondriale, la cellula ipossica genera ATP principalmente tramite glicolisi

anaerobia nel citoplasma, aumenta l'utilizzo del glucosio incrementando la sintesi dei trasportatori del glucosio (Glut 1 e 3) e di diversi enzimi glicolitici (Ebert BL et al., 1995; Semenza GL et al., 1994).

In molti tipi cellulari si ha un arresto reversibile del ciclo cellulare e un accumulo delle cellule in fase G<sub>1</sub> (Graeber T et al., 1994); diversi studi dimostrano come l'arresto in G<sub>1</sub> indotto dall'ipossia sia associato ad una diminuzione dell'attività di alcuni complessi ciclina-CDK, che portano all'iperfosforilazione della proteina Rb (retinoblastoma) e all'arresto del ciclo cellulare (Krtolica A et al., 1998). Negli ultimi anni è emerso da diversi studi come l'ipossia possa alterare la crescita cellulare in due modi diversi: tramite morte cellulare programmata o arresto nella crescita. Nelle cellule trasformate l'ipossia può provocare apoptosi tramite la via di p53, quindi questo può rappresentare un potente meccanismo di selezione dei mutanti per p53 nelle popolazioni tumorali; le cellule non trasformate invece possono andare incontro ad arresto del ciclo cellulare bloccandosi al passaggio fra la fase G<sub>1</sub> e S, senza alterazioni della vitalità (Schmaltz C et al., 1998; Gardner LB et al., 2001).

Le risposte cellulari indotte dall'ipossia dipendono principalmente da alterazioni nell'espressione genica, eventi controllati sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale, mediante i quali alcuni geni sono regolati positivamente e altri rimangono inattivi o vengono repressi.

A differenza della maggior parte degli stimoli extracellulari, per i quali il segnale deve essere tradotto dall'esterno della cellula al nucleo, portando all'attivazione di specifici fattori di trascrizione e dei loro geni target, l'ossigeno può diffondere facilmente nella cellula e attivare direttamente le risposte cellulari.

E' noto che le alterazioni della trascrizione causate dall'ipossia sono mediate principalmente da un fattore di trascrizione specifico, chiamato HIF (*hypoxia inducible factor*), ma recentemente è stata dimostrata l'attivazione anche di altri fattori di trascrizione ed è stato visto come nella risposta allo stress ipossico siano coinvolti anche processi HIF-indipendenti.

### **La scoperta dell'*hypoxia inducible factor* (HIF)**

Alla fine degli anni '80 fu scoperto che il gene per l'eritropoietina (EPO), un ormone che stimola la proliferazione eritrocitaria, viene trascritto in condizioni di ipossia (Goldberg MA et al., 1988); questo fu poi utilizzato come prototipo per studiare i geni indotti dall'ipossia e i fattori di trascrizione regolati dai livelli di ossigeno.

Il gene umano per EPO contiene al 3' un elemento *enhancer* che viene attivato in condizioni di bassa tensione di ossigeno: questo portò alla scoperta di un elemento di risposta all'ipossia (*hypoxia response element*, HRE, 5'-RCGTG-3'), responsabile della trascrizione genica indotta dall'ipossia (Semenza GL et al., 1991).

In seguito il gruppo di Semenza identificò e clonò il fattore di trascrizione responsabile del legame alle sequenze HRE, e questo fu chiamato *hypoxia inducible factor*, o HIF (Semenza GL and Wang GL, 1992; Wang GL et al., 1995); in seguito divenne HIF-1, con la subunità inducibile HIF-1 $\alpha$ .

Fu visto che HIF-1 legava il DNA e mediava l'espressione di un gene reporter contenente le sequenze HRE sia in cellule esprimenti EPO sia in cellule che non esprimevano tale proteina, suggerendo quindi una sua funzione generale di attivatore della trascrizione in condizioni di ipossia. In seguito, in diversi geni inducibili in ipossia, furono scoperte sequenze regolatorie molto simili alla sequenza HRE di EPO, ad esempio nel gene del *vascular endothelial growth factor* (VEGF), che media l'angiogenesi, nel gene per il trasportatore 1 del glucosio, e nei geni di enzimi glicolitici come la fosfoglicerato-cinasi e l'aldolasi (Goldberg MA et al., 1994; Ebert BL et al., 1995; Firth JD et al., 1994). Perciò si scoprì che HIF-1 $\alpha$  svolge un ruolo generale nel mediare diverse risposte fisiologiche all'ipossia, a partire da processi che rispondono rapidamente alla carenza di ossigeno, come l'eritropoiesi e la glicolisi, fino a soluzioni a lungo termine come l'angiogenesi.

Poco dopo la scoperta di HIF-1 $\alpha$ , fu isolato e clonato anche il fattore HIF-2 $\alpha$ , chiamato anche *endothelial Per-ARNT-Sim (PAS) protein* (EPAS), *HIF-like factor* (HLF) o *HIF-related factor* (HRF) (Tian H et al., 1997; Ema M et al., 1997). Studi successivi hanno dimostrato che, a differenza di HIF-1 $\alpha$ , che è espresso ubiquitariamente, HIF-2 $\alpha$  si trova principalmente nel polmone, nell'endotelio e nei corpi carotidei (Tian H et al., 1998).

HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  condividono molte caratteristiche strutturali e biochimiche, ma hanno funzioni non ridondanti; studi su topi knock-out hanno dimostrato che sia

HIF-1 $\alpha$  sia HIF-2 $\alpha$  hanno un'importanza fondamentale per lo sviluppo e la sopravvivenza embrionale, ma i topi knock-out per HIF-2 $\alpha$  mostrano fenotipi diversi dipendenti dalle loro caratteristiche genetiche (Kotch LE et al., 1999; Compornolle V et al., 2002); inoltre HIF-2 $\alpha$  non può sostituire funzionalmente HIF-1 $\alpha$  nelle cellule embrionali staminali (Hu CJ et al., 2006). A differenza di HIF-1 $\alpha$ , i cui geni target sono stati ampiamente studiati, solo negli ultimi anni sta emergendo l'importanza del ruolo fisiologico di HIF-2 $\alpha$ .

Nel 1998 è stato isolato e caratterizzato nei mammiferi anche un terzo membro della famiglia di HIF- $\alpha$ , che è stato chiamato HIF-3 $\alpha$  (Gu YZ et al., 1998), questo è espresso principalmente nel timo, nel polmone, nel cervello, nel cuore e nel fegato, esiste in diverse varianti di splicing (Maynard MA et al., 2003) e le sue funzioni sono ancora poco conosciute.

### **Struttura di HIF**

HIF è un fattore di trascrizione eterodimerico, formato dall'associazione di due diversi componenti: un membro della famiglia HIF- $\alpha$ , che costituisce la subunità ossigeno-sensibile, e la subunità costitutiva HIF- $\beta$ , di 789 amminoacidi, conosciuta anche come *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT), perché fu originariamente identificato come partner eterodimerico dell'*aryl hydrocarbon receptor* (AHR) (Reyes H et al., 1992).

Entrambe le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  appartengono ad una famiglia di proteine caratterizzate dalla presenza di un dominio *basic helix-loop-helix* (bHLH) e un numero variabile di domini PAS (acronimo derivante dalle prime proteine, PER, ARNT, SIM, in cui il dominio è stato identificato) (Jiang BH et al., 1996; Yang J et al., 2005).

HIF-1 $\alpha$  è una proteina di 826 amminoacidi, presenta nella regione N-terminale un dominio bHLH e un dominio PAS, che sono essenziali per la dimerizzazione con HIF-1 $\beta$  e per il legame con le sequenze conservate HRE del DNA (Wang GL et al., 1995).

HIF-1 $\alpha$  contiene poi due domini transattivi (TADs), chiamati N-TAD (*N-terminal transactivator domain*, residui 531-575) e C-TAD (*C-terminal transactivator domain*, residui 786-826): questi hanno la funzione principale di reclutare ed interagire con dei coattivatori, come CBP/p300, SRC-1 e TIF-2, che sono fondamentali per l'attivazione trascrizionale dei geni target (Arany Z et al., 1996; Carrero P et al., 2000). Sui domini TAD avvengono modifiche post-

traduzionali di idrossilazione, fosforilazione, acetilazione e modificazioni redox, che regolano l'attività di HIF-1 $\alpha$ .

Fra questi due domini TAD si trova un dominio inibitore (residui 576-785), che, se deletto, aumenta la funzionalità dei domini transattivatori in condizioni normossiche (Pugh CW et al., 1997).

Si hanno poi due segnali di localizzazione nucleare, sia al C-terminale che all'N-terminale (residui 17-74 e 718-721), che hanno la capacità di traslocare HIF-1 $\alpha$  nel nucleo, indipendentemente dalla dimerizzazione con HIF-1 $\beta$  (Kallio PJ et al., 1998).

Infine, una componente fondamentale è il dominio di degradazione ossigeno dipendente (*oxygen-dependent degradation domain*, ODD, residui 401-603) che permette di regolare la stabilità della proteina in funzione della concentrazione di ossigeno: in condizioni normossiche, il dominio ODD causa una rapida degradazione di HIF-1 $\alpha$  attraverso la via ubiquitina-proteasoma (Ivan M et al., 2001; Jaakkola P et al., 2001), inoltre questo dominio contiene due sequenze PEST, coinvolte anch'esse nella regolazione della degradazione di HIF-1 $\alpha$ .

HIF-2 $\alpha$ , di 870 amminoacidi, è molto simile alla isoforma HIF-1 $\alpha$ , condivide con questo il 48% della sequenza aminoacidica e mostra molte omologie strutturali e biochimiche, ad esempio la capacità di dimerizzare con la subunità HIF-1 $\beta$  e di legare le sequenze HRE.

HIF-3 $\alpha$  è la isoforma più piccola (667 amminoacidi) e mostra alcune differenze strutturali con le altre due isoforme  $\alpha$ ; anch'essa dimerizza con HIF-1 $\beta$  e lega le sequenze HRE. Questo fattore sembra essere coinvolto anche nella *down*-regolazione della risposta ipossica, infatti una forma di splicing alternativo produce un fattore con funzione inibitoria su HIF-1 $\alpha$ , chiamato IPAS (Makino Y et al., 2002), che è espresso soprattutto nelle cellule del Purkinje del cervelletto e della cornea. IPAS interagisce con la regione ammino-terminale di HIF-1 $\alpha$  e impedisce il legame con il DNA; può essere indotto dall'ipossia anche nel cuore e nel polmone, contribuendo alla regolazione a feedback dell'attività di HIF-1 $\alpha$  in molti tessuti.

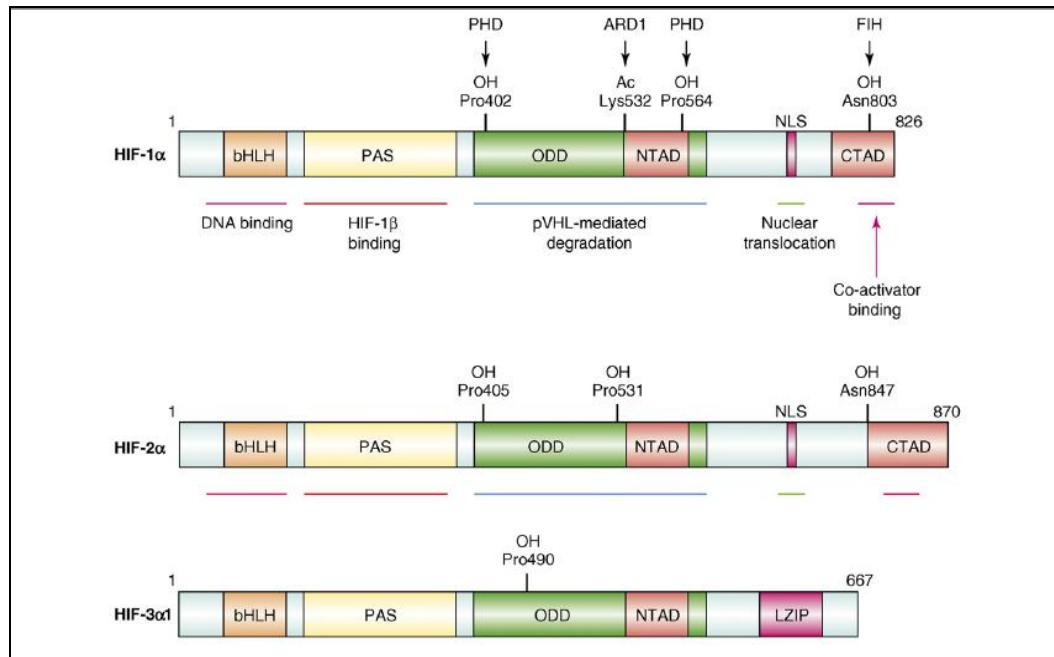


Figura 14. Struttura delle tre isoforme di HIF- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ): dominio bHLH e dominio PAS, che permettono il legame al DNA e la dimerizzazione con la subunità HIF-1 $\beta$ , domini transattivatori C-TAD e N-TAD, che legano i coattivatori trascrizionali, segnale di localizzazione nucleare NLS, e dominio ODD, sede dei principali meccanismi di regolazione di HIF.

### Regolazione di HIF

Il fattore di trascrizione HIF-1 ha la funzione principale di mediare le risposte adattative alle variazioni di ossigeno tissutale; è costituito dalla subunità costitutiva HIF-1 $\beta$ , che è espressa ubiquitariamente ed è mantenuta ad una concentrazione costante indipendentemente dalla pressione di ossigeno presente (Kallio PJ et al. 1997), e da una subunità HIF- $\alpha$ , che costituisce la parte sensibile all'ossigeno e la cui espressione è strettamente regolata.

Come per ogni proteina, l'espressione di HIF-1 $\alpha$  è determinata dal tasso di sintesi e di degradazione: nel caso di HIF-1 $\alpha$ , la trascrizione e la sintesi sono costitutive e non sembrano essere influenzate dall'ossigeno, mentre la degradazione è principalmente dipendente dall'ossigeno.

In condizioni di normossia HIF-1 $\alpha$  ha una emivita molto breve ( $t_{1/2} \sim 5$  minuti) e viene rapidamente degradato attraverso la via ubiquitina-proteasoma dipendente (Salceda S et al., 1997). Quando le cellule sono esposte a basse tensioni di ossigeno, invece, l'emivita di HIF-1 $\alpha$  aumenta fino a circa 30 minuti, il fattore diventa stabile e trasloca nel nucleo, dove dimerizza con HIF-1 $\beta$  e forma così il complesso HIF

trascrizionalmente attivo; questo si associa alle sequenze HRE nelle zone regolatorie dei geni target e lega coattivatori trascrizionali, che inducono l'espressione genica (Lando D et al., 2002).

La stabilità e l'attività di HIF-1 $\alpha$  sono strettamente regolate, principalmente tramite modificazioni post-traduzionali: idrossilazioni, ubiquitinazioni, acetilazioni e fosforilazioni.

L'instabilità di HIF-1 $\alpha$  in condizioni di normossia è mediata principalmente da reazioni di idrossilazione sul dominio ODD (Huang LE et al., 1998).

In condizioni di alta tensione di ossigeno, HIF-1 $\alpha$ , appena sintetizzato, viene rapidamente idrossilato sulle proline 402 e 564, localizzate nel dominio ODD, ad opera di tre prolil-idrossilasi, chiamate nell'uomo *prolyl hydroxylase-domain protein* (PHD) 1-3. I residui di prolina sono conservati in HIF-2 $\alpha$  (Pro405 e Pro530) e HIF-3 $\alpha$  e si trovano all'interno di una sequenza consenso, LXXLAP, conservata nei due siti per tutte le isoforme, ad eccezione della seconda prolina di HIF-3 $\alpha$ , che ha una sequenza LXXLHP (Bruick RK et al., 2001; Masson N et al., 2001).

Le PHD sono delle diossigenasi, (*2-oxoglutarate-dependent-dioxygenases*), utilizzano l'ossigeno molecolare O<sub>2</sub> e l' $\alpha$ -chetoglutarato come substrati, Fe<sup>2+</sup> e ascorbato come cofattori; il processo di idrossilazione prevede la scissione della molecola di O<sub>2</sub>, un atomo viene trasferito al residuo di prolina, l'altro invece reagisce con l' $\alpha$ -chetoglutarato generando succinato e CO<sub>2</sub> (Bruick RK et al., 2001). In condizioni fisiologiche l'O<sub>2</sub> è un substrato limitante e questo fa sì che la regolazione di HIF-1 $\alpha$  sia ossigeno-dipendente (Jiang BH et al., 1996).

Le tre PHD sono tutte in grado di idrossilare HIF- $\alpha$  *in vitro*, ma PHD2 possiede l'attività maggiore (attività relativa PHD2>>PHD3>PHD1) ed è stato dimostrato che questa è la principale regolatrice del turnover di HIF-1 $\alpha$  *in vivo* (Huang J et al., 2002). Silenziando PHD2, HIF-1 $\alpha$  diventa stabile in condizioni di normossia, mentre l'inibizione di PHD1 e PHD3 non produce gli stessi effetti (Berra E et al., 2003). Inoltre l'ipossia induce l'espressione sia di PHD2 che di PHD3, mentre non influenza PHD1 (Epstein AC et al., 2001), questo potrebbe rappresentare un meccanismo tramite il quale HIF-1 $\alpha$  regola la sua stessa attività.

PHD2 è localizzato principalmente nel citoplasma, mentre PHD1 si trova principalmente nel nucleo e PHD3 in entrambi i compartimenti, PHD2 è comunque in grado di spostarsi tra il citoplasma e il nucleo, contribuendo quindi alla

degradazione di HIF-1 $\alpha$  in entrambi i compartimenti (Metzen E et al., 2003). Tutte e tre le isoforme sono espresse in molti tessuti, ma mostrano un'overespressione tessuto-specifica: PHD2 è abbondante nel tessuto adiposo, PHD3 nel cuore e nella placenta e PHD1 nei testicoli (Oehme F et al., 2002; Lieb ME et al., 2002). Le differenze nell'attività enzimatica delle tre isoforme, la diversa localizzazione subcellulare e la distribuzione tissutale possono rendere conto di una risposta all'ipossia graduale e tessuto-specifica.

L'idrossilazione delle proline Pro-402 e Pro-564 è un punto chiave nella via di degradazione di HIF-1 $\alpha$ , infatti permette l'interazione della proteina oncosoppressore von-Hippen-Lindau (pVHL) con il dominio ODD idrossilato di HIF-1 $\alpha$  (Ivan M et al., 2001). pVHL è una componente del complesso E3 ubiquitina-ligasi, che indirizza le proteine alla proteolisi ubiquitino-mediata nel proteasoma (Cockman M et al., 2000). Inibitori del proteasoma o mutazioni dell'enzima E1 stabilizzano HIF-1 $\alpha$ , dimostrando che in condizioni normossiche HIF-1 $\alpha$  è degradato mediante ubiquitinazione e degradazione proteasomica (Huang LE et al., 1998; Salceda S et al., 1997).

In presenza di ossigeno, le PHD sono attive e idrossilano le proline di HIF-1 $\alpha$ , permettendo il legame di VHL e la successiva ubiquitinazione, con conseguente degradazione di HIF-1 $\alpha$ ; l'assenza di ossigeno causa una mancanza di attività dell'enzima, non si ha modificazione delle proline né legame di pVHL con HIF-1 $\alpha$ , questo porta ad una stabilizzazione di HIF-1 $\alpha$  e ad un suo accumulo nella cellula. L'assoluta necessità di ossigeno come co-substrato fa sì che le PHD funzionino da sensori di ossigeno cellulari.

Quando le proline di HIF-1 $\alpha$  sono idrossilate, si ha il legame con pVHL, questo si associa alle proteine elongina C, elongina B, cullina-2 e Rbx1, formando il complesso VCB-Cul2 E3 ligasi. Il legame di HIF-1 $\alpha$  a questo complesso multiproteico E3 causa la poliubiquitinazione di HIF-1 $\alpha$ , portando alla sua degradazione nel proteasoma (Kamura T et al., 2000).

pVHL è una proteina oncosoppressore e una sua mutazione è coinvolta nello sviluppo di diversi tipi di tumore (Iliopoulos O et al., 1998; Schoenfeld A et al., 1998); è chiamata così perchè fu scoperta nella sindrome di von Hippen-Lindau (VHL), una malattia ereditaria caratterizzata dallo sviluppo di tumori multipli. In cellule in cui pVHL è mutata, HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  risultano stabili e attivi in normossia,

provocano un'overespressione dei geni indotti dall'ipossia, e contribuiscono così alla progressione tumorale (Iliopoulos O et al., 1996).

Il complesso pVHL-ligasi E3 è espresso in modo ubiquitario nei diversi tessuti, è localizzato prevalentemente nel citoplasma, ma è in grado di spostarsi fra nucleo e citoplasma, rendendo possibile la degradazione di HIF-1 $\alpha$  in entrambi i compartimenti (Berra E et al., 2001).

Sempre all'interno del dominio ODD di HIF-1 $\alpha$ , la lisina al residuo 532 può essere acetilata da una acetil-transferasi chiamata ARD1 (*arrest-defective 1*) (Jeong JW et al., 2002); l'acetilazione di Lys532 favorisce l'interazione di HIF-1 $\alpha$  con pVHL e quindi destabilizza HIF-1 $\alpha$ . L'importanza di questa modifica nella regolazione di HIF-1 $\alpha$  è dimostrata dal fatto che una mutazione della Lys532 in arginina provoca un aumento della stabilità di HIF-1 $\alpha$  (Tanimoto K et al., 2000); inoltre il mantenimento o l'aumento dello stato acetilato di HIF-1 $\alpha$ , ottenuto con l'acido butirrico, che è un inibitore generale delle deacetilasi, provoca una riduzione della quantità di proteina presente (Kim MS et al., 2001). Poiché l'attività delle acetiltransferasi non è influenzata dall'ossigeno, ARD1 può essere attiva e acetilare HIF-1 $\alpha$  indipendentemente dalle condizioni di ossigeno, nonostante questo però è stato visto che sia l'mRNA che la proteina ARD1 sono molto meno presenti in ipossia e questo può causare una minor acetilazione di HIF-1 $\alpha$  in ipossia rispetto alla normossia (Jeong GW et al., 2002).

L'altro principale meccanismo di regolazione dell'attività di HIF riguarda la modulazione dei domini di transattivazione N-TAD e C-TAD, che sono coinvolti nel legame con i coattivatori trascrizionali.

In condizioni di normossia, l'idrossilazione del residuo di asparagina Asn803 in HIF-1 $\alpha$  e Asn851 in HIF-2 $\alpha$  (Sang N et al., 2002) provoca un'inibizione sterica dell'interazione tra HIF-1 $\alpha$  e il suo co-attivatore CBP/p300 e impedisce quindi il reclutamento di quest'ultimo, che è fondamentale per l'attivazione di HIF-1 $\alpha$ . In ipossia non si ha idrossilazione dell'asparagina, questo permette la corretta interazione del dominio C-TAD di HIF-1 $\alpha$  con CBP/p300 e l'attivazione della trascrizione dei geni target (Lando D et al., 2002).

Il responsabile di questa regolazione è una asparagil-idrossilasi, inizialmente descritta come fattore inibitore di HIF-1, FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*) (Mahon PC

et al., 2001). Come le PHD, anche FIH-1 è una diossigenasi 2-OG-dipendente e utilizza come cofattori  $\text{Fe}^{2+}$  e ascorbato, l'utilizzo dell'ossigeno come substrato rende questo enzima un secondo sensore dell'ossigeno. FIH-1 è localizzato prevalentemente nel citoplasma, ma una piccola frazione si trova anche nel nucleo, la sua trascrizione è indipendente dalla concentrazione di ossigeno e ha la funzione di regolare non la stabilità di HIF-1 $\alpha$ , ma la sua attività (Metzen E et al., 2003).

Oltre a quelli descritti finora, esistono anche altri meccanismi che regolano la stabilità di HIF-1, indipendenti dalle idrossilasi, ad esempio lo chaperone molecolare Hsp90 è un regolatore della stabilità di HIF-1 ed è indipendente da pVHL e dall'ossigeno (Isaacs JS et al., 2002).

E' stata descritta per HIF-1 $\alpha$  anche una regolazione per fosforilazione diretta, ad opera delle MAPK: sia p42/44 che p38 fosforilano HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , sia *in vitro* che *in vivo* (Richard DE et al., 1999). Sembra che la fosforilazione non influenzi la stabilità di HIF-1 $\alpha$  o il suo legame al DNA, ma piuttosto aumenti l'attività trascrizionale di HIF-1; una spiegazione di questo potrebbe essere che HIF-1 $\beta$  legghi preferenzialmente la forma fosforilata di HIF-1 $\alpha$ . La fosforilazione porta quindi all'attivazione di HIF-1 $\alpha$  e alla trascrizione dei suoi geni target, come il VEGF e l'eritropoietina.

Altre modifiche post-traduzionali a carico di HIF-1 $\alpha$  sono la S-nitrosazione sulla cisteina Cys800, che favorisce l'interazione con CBP/p300 e quindi l'attività trascrizionale di HIF-1 $\alpha$  (Yasinska IM et al., 2003), e la SUMOilazione, che può promuovere sia la stabilizzazione che la degradazione di HIF-1 $\alpha$ .

L'ipossia induce l'espressione di SUMO-1 (*small ubiquitin-like modifier*) (Shao R et al., 2004), e favorisce così la sumoilazione di HIF-1 $\alpha$ . A questo processo era stato inizialmente attribuito un aumento di stabilità della proteina, però dati recenti dimostrano che può anche favorire la degradazione di HIF-1 $\alpha$ : infatti la sumoilazione favorisce il legame di HIF-1 $\alpha$  con il complesso pVHL-E3 ligasi, in maniera indipendente dall'idrossilazione delle proline, favorendo così l'ubiquitinazione e la degradazione di HIF-1 $\alpha$ . In ipossia, la degradazione di HIF-1 $\alpha$  mediata dalla sumoilazione è bloccata da SENP1 (*SUMO1/sentrin specific peptidase 1*), una proteasi nucleare che rimuove SUMO da HIF-1 $\alpha$ ; il knockdown di SENP1 diminuisce l'espressione di HIF-1 $\alpha$ , embrioni SENP1<sup>-/-</sup> manifestano una grave anemia fetale dovuta ad una carenza nell'espressione dell'eritropoietina, dimostrando

quindi il ruolo fisiologico di SENP1 nella regolazione di HIF-1 $\alpha$  (Cheng J et al., 2007).

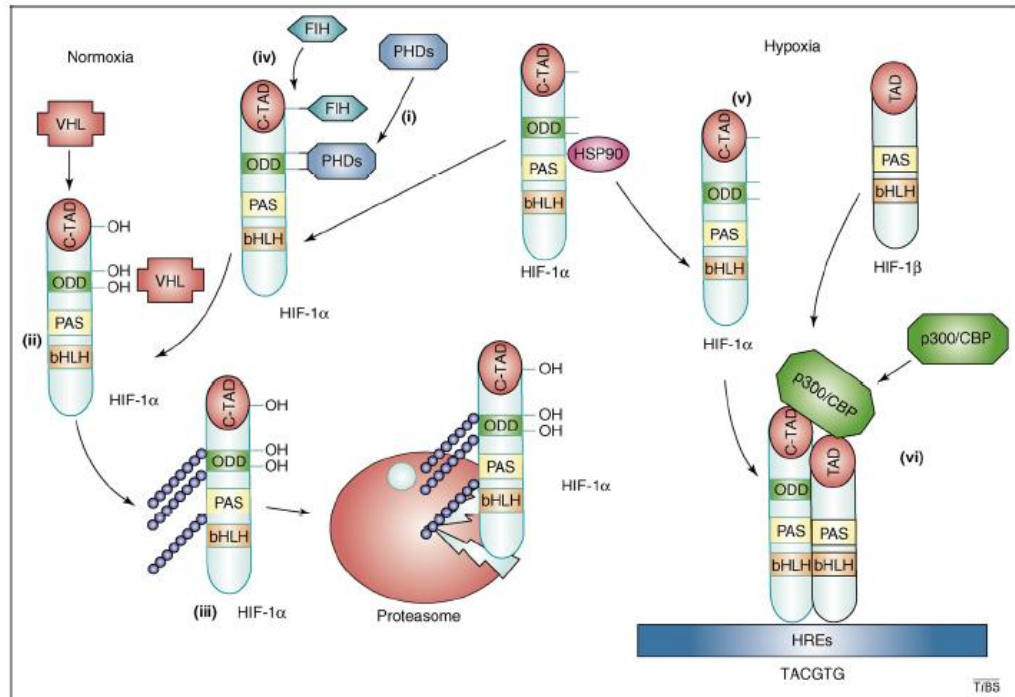


Figura 15. Meccanismi di regolazione di HIF-1 $\alpha$ , che determinano la sua stabilità e la sua attività trascrizionale: reazioni di idrossilazione, ubiquitinazione, acetilazione, fosforilazione.

La sintesi di HIF-1 $\alpha$  invece è regolata a livello trascrizionale, principalmente ad opera di fattori di crescita, e non è dipendente dalla concentrazione di ossigeno (fig. 16). L'aumento di HIF-1 $\alpha$  in risposta alla stimolazione con fattori di crescita differisce quindi dall'aumento in condizioni di ipossia perché non è associata ad una diminuita degradazione di HIF-1 $\alpha$ , ma ad un'attivazione della sua sintesi attraverso le vie di PI3K o delle MAPK (Fukuda R et al., 2002; Fukuda R et al., 2003; Laughner E et al., 2001; Zhong H et al., 2000); inoltre, a differenza dell'ipossia, che aumenta l'espressione di HIF-1 $\alpha$  in tutti i tipi cellulari, la stimolazione con fattori di crescita induce l'espressione di HIF-1 $\alpha$  in cellule specifiche.

Le principali vie di segnalazione attivate dai recettori dei fattori di crescita, che trasducono segnali di proliferazione e sopravvivenza, inducono quindi anche l'espressione di HIF-1 $\alpha$ . Questa può essere vista come una strategia preventiva per mantenere l'omeostasi dell'ossigeno: infatti più cellule sono presenti in un tessuto

più ossigeno è consumato e, quando una cellula si divide in due cellule figlie, aumenta il consumo di ossigeno. Le cellule proliferanti esprimono VEGF, che stimola l'angiogenesi, aumentando così la perfusione tissutale, necessaria a mantenere l'ossigenazione di un maggior numero di cellule; inoltre in condizioni di proliferazione le cellule utilizzano preferenzialmente la via glicolitica piuttosto che il metabolismo ossidativo per generare ATP (Brand KA et al., 1997). L'induzione dell'angiogenesi e della glicolisi nelle cellule in proliferazione è mediata in parte dall'attivazione di HIF-1 $\alpha$ .

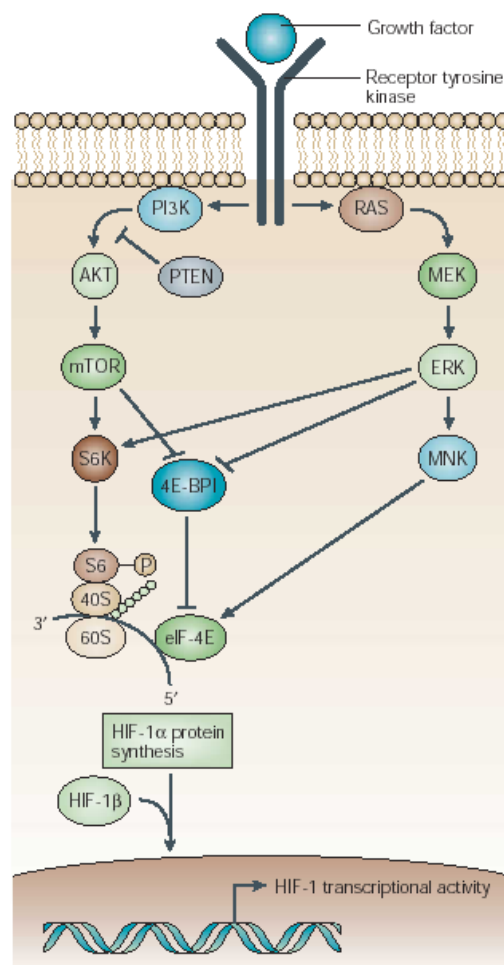


Figura 16. Regolazione della sintesi di HIF-1 $\alpha$ : i principali fattori di crescita inducono l'espressione di HIF-1 $\alpha$ , tramite l'attivazione delle vie di segnalazione di MAPK e PI3K.

### **Attivazione di HIF in normossia**

Oltre al suo ruolo prevalente nel mediare le risposte all'ipossia, diversi dati ipotizzano che HIF possa essere attivo anche nelle cellule ossigenate.

Abbiamo già visto come HIF-1 $\alpha$  risponda anche a stimoli non ipossici, quali ormoni, fattori di crescita, fattori di coagulazione, peptidi vasoattivi e citochine; sembra che in condizioni normossiche HIF svolga una funzione autocrina nello stimolo alla proliferazione, alla sopravvivenza e nella riparazione dei tessuti, permettendo risposte rapide alle variazioni ambientali.

La stabilizzazione di HIF nelle cellule ossigenate sembra essere mediata dai ROS, che vengono indotti nella cascata del segnale di molti dei fattori citati prima: infatti, l'incubazione delle cellule con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o un qualunque stress ossidativo causano una stabilizzazione di HIF e l'attivazione dei suoi geni bersaglio, anche quando i livelli di ossigeno sono elevati (Chandel NS et al., 1998; Duyndam MC et al., 2001). Trattamenti con agenti anti-ossidanti riducono l'accumulo di HIF-1 $\alpha$  e l'espressione dei geni bersaglio in molte cellule (Haddad JJ et al., 2001; Tacchini L et al., 2001). Questo dimostra quindi che la stabilità di HIF è sensibile allo stato redox in molte cellule ossigenate e che i ROS sono necessari e sufficienti per stabilizzare le proteine HIF- $\alpha$ .

La funzione dei ROS nella stabilizzazione di HIF sembra essere principalmente quella di modulare l'attività delle PHD. Le PHD funzionano in base alla disponibilità di ossigeno, ma per essere pienamente attive hanno bisogno anche della presenza di ossiglutarato e dello ione Fe<sup>2+</sup>. Usando cellule mancanti di *junD*, che manifestano uno stress ossidativo cronico, è stato scoperto che la regolazione in base al ferro delle PHD è dipendente da ROS (Gerald D et al., 2004). La produzione di ROS interferisce con la disponibilità di Fe<sup>2+</sup> nel sito catalitico prolil-idrossilasico, inibendo l'attività dell'enzima in condizioni di normossia: elevati livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favoriscono l'ossidazione di Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>, quindi un'elevata produzione di ROS riduce la presenza di Fe<sup>2+</sup> nella cellula e aumenta la percentuale di PHD nello stato ossidato con Fe<sup>3+</sup> e quindi inattivo. L'aggiunta di Fe<sup>2+</sup> nelle cellule *junD*<sup>-/-</sup> riduce i livelli di HIF-1 $\alpha$ , e lo stesso effetto si ha utilizzando agenti riducenti come la cisteina e il glutatione, o anti-ossidanti come l'ascorbato: a concentrazioni fisiologiche l'ascorbato aumenta l'attività delle PHD e la degradazione di HIF, favorendo la disponibilità di Fe<sup>2+</sup> nel sito attivo delle idrossilasi (Knowles HJ et al., 2003).

Anche l'attività di FIH è dipendente dalla presenza di ossigeno, ossiglutarato e  $Fe^{2+}$ ; come le PHD, anche questo enzima è sensibile alla diminuita disponibilità di  $Fe^{2+}$  indotta dai ROS e promuove così l'accumulo di HIF.

Inoltre è stato visto che alcuni metaboliti del glucosio, come i 2-ossiacidi, possono occupare il sito di legame dell'ossiglutarato nelle PHD e inibire in questo modo la loro attività enzimatica; questa inibizione viene annullata in presenza di ascorbato, agenti riducenti o se si aggiunge  $Fe^{2+}$ , dimostrando quindi che l'inibizione delle PHD da parte dei 2-ossiacidi è dovuta all'ossidazione dello ione ferro (Lu H et al., 2005).

Le PHD quindi non hanno solo la funzione di segnalare variazioni nei livelli di ossigeno cellulare, ma possono essere regolate anche da diverse vie di segnalazione: vari tipi di stress cellulari e le vie metaboliche possono indurre l'attivazione di HIF anche in cellule ben ossigenate (fig. 17).

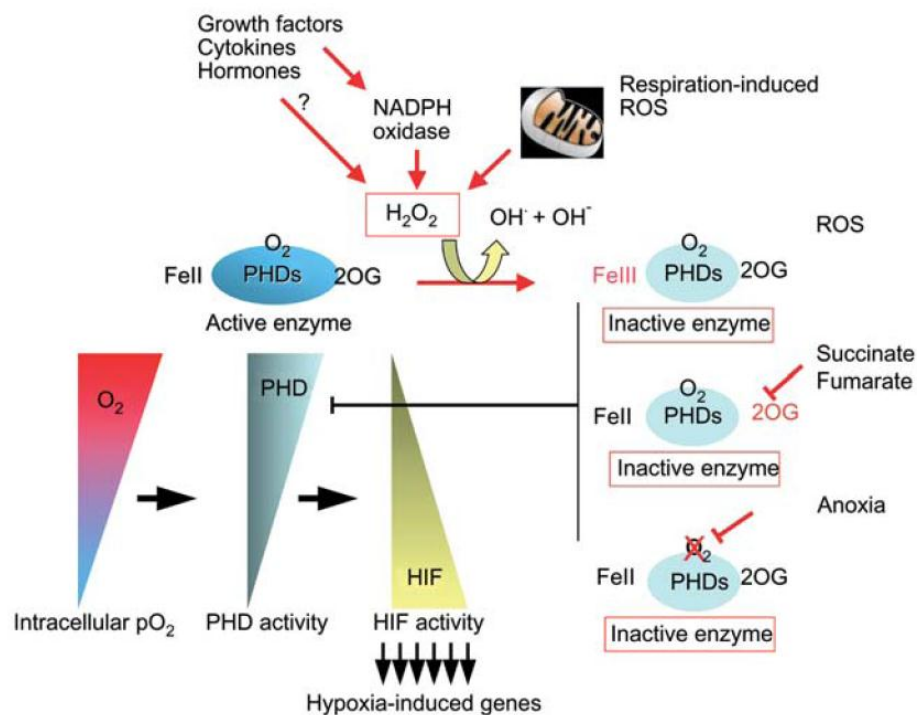


Figura 17. Regolazione delle PHD: variazioni nella disponibilità di O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup> e ossiglutarato inibiscono l'attivazione delle PHD e quindi attivano HIF. Diversi stimoli fisiologici regolano l'attività delle PHD, anche in normossia, le PHD sono regolate dalla concentrazione di ossigeno, ma anche dai ROS e da metaboliti come il succinato e il fumarato.

## **I geni bersaglio di HIF**

Il fattore di trascrizione HIF-1 è il principale regolatore della risposta ipossica, fino ad oggi sono stati scoperti moltissimi geni attivati da HIF, coinvolti nell'adattamento all'ipossia, e il loro numero è in continuo aumento.

In ipossia HIF-1 risulta stabile e attivo e regola l'espressione genica legandosi alle sequenze HRE; per attivare la trascrizione della maggior parte dei suoi geni bersaglio, HIF si lega al coattivatore trascrizionale p300 o CBP (Ruas JL et al., 2005), ma possono essere coinvolti anche altri meccanismi di attivazione o altri cofattori (Kasper LH et al., 2005; Kasper LH et al., 2006). Tutte le cellule e gli organismi hanno bisogno di adattarsi alle variazioni della concentrazione di ossigeno, perciò la maggior parte dei geni bersaglio di HIF-1 sono regolati in modo tessuto-specifico; questa specificità è resa possibile dall'interazione di HIF-1 con altri fattori di trascrizione, che determina in ogni particolare cellula ipossica il sottogruppo di geni che saranno attivati da HIF-1.

L'attivazione di questi geni ha lo scopo di assicurare sia che le cellule recuperino l'omeostasi dell'ossigeno, sopravvivendo con la produzione di energia minima ottenuta con la glicolisi, sia che le cellule muoiano se persiste la mancanza di ossigeno.

Per prima cosa, in condizioni di carenza di ossigeno è necessario ristabilire un corretto trasporto di ossigeno nel sangue. Si ha una *up*-regolazione dei geni responsabili dell'eritropoiesi, come EPO, che stimola la formazione delle cellule rosse del sangue, aumentando così il numero di eritrociti (Semenza GL et al., 1991). Inoltre, per garantire una corretta sintesi di emoglobina, poiché la produzione di eme è regolata dalla disponibilità di ferro, si ha una *up*-regolazione dei geni coinvolti nel metabolismo del ferro. In ipossia viene incrementata l'espressione della transferrina (Tf), che trasporta  $Fe^{3+}$  nel sangue, del recettore della transferrina (Tfr), che rende possibile l'*uptake* del ferro, e della ceruloplasmina (o ferrossidasi) che ossida lo ione ferroso  $Fe^{2+}$  a ferrico  $Fe^{3+}$  (Rolfs A et al., 1997; Bianchi L et al., 1999; Mukhopadhyay CK et al., 2000).

Per aumentare la vascolarizzazione e diminuire quindi la distanza di diffusione dell'ossigeno, viene stimolata anche l'angiogenesi. In ipossia sono indotti molti geni coinvolti in diversi passaggi dell'angiogenesi, fra questi uno dei principali è il *vascular endothelial growth factor* (VEGF), il più potente mitogeno specifico per

l'endotelio, che richiama le cellule endoteliali nelle zone ipossiche e non vascolarizzate e stimola la loro proliferazione (Levy AP et al., 1995). HIF-1 $\alpha$  attiva la trascrizione dei geni di vari altri fattori pro-angiogenici e di geni coinvolti nella regolazione del tono vascolare, come l'ossido nitrico sintasi (NOS2) (Melillo G et al., 1995), l'eme-ossigenasi 1 (Lee PJ et al., 1997), l'endotelina 1 (ET1) (Hu J et al., 1998), l'adrenomodulina (Nguyen SV et al., 1999) e il recettore  $\alpha_{1B}$ -adrenergico (Eckhart AD et al., 1997). Inoltre l'ipossia induce l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo della matrice e nella maturazione dei vasi, come le metalloproteasi (MMPs) (Ben-Yosef Y et al., 2002), i recettori dell'attivatore del plasminogeno e degli inibitori del plasminogeno (PAIs) (Kietzmann T et al., 1999) e la collagene-prolil-idrossilasi (Takahashi Y et al., 2000).

Per quanto riguarda il metabolismo energetico, in condizioni di carenza di ossigeno le cellule passano da un metabolismo del glucosio di tipo ossidativo (ciclo degli acidi tricarbossilici) ad un metabolismo prevalentemente glicolitico, che è indipendente dall'ossigeno (Firth JD et al., 1995; Semenza GL et al., 1996; Iyer NV et al., 1998). La glicolisi produce però solo 2 molecole di ATP per ogni glucosio, a differenza del ciclo degli acidi tricarbossilici che porta alla formazione di 38 molecole di ATP, quindi le cellule ipossiche aumentano la loro capacità di produrre energia incrementando l'*uptake* del glucosio. L'ipossia e HIF inducono l'espressione genica dei trasportatori del glucosio 1 e 3 (Chen et al., 2001) e di diversi enzimi glicolitici (ad esempio la fosfofruttochinasi 2 e la fruttosio-2,6-bisfosfato), inoltre si ha l'induzione della piruvato deidrogenasi 1 e della lattato deidrogenasi, che diminuiscono la disponibilità di piruvato incrementando la conversione in lattato e causando quindi un'inibizione del ciclo di Krebs (Brahimi-Horn MC et al., 2007). I prodotti del metabolismo glicolitico, in particolare lattato e piruvato, causano un accumulo di HIF-1 $\alpha$  in normossia e regolano l'espressione dei geni indotti dall'ipossia, creando così un controllo a feedback positivo (Lu H et al., 2002).

Il passaggio ad un metabolismo prevalentemente glicolitico e quindi anaerobio incrementa la produzione di acido lattico e di CO<sub>2</sub>, che potrebbero causare un'acidosi intracellulare. Per contrastare questo effetto, HIF-1 attiva l'espressione del trasportatore monocarbossilico 4 (MTC4), che permette l'efflusso di acido lattico, e dell'anidrasi carbonica IX, che catalizza la conversione della CO<sub>2</sub> extracellulare in acido carbonico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); questo comporta un'acidificazione dello spazio

extracellulare, mentre all'interno della cellula il pH aumenta grazie all'ingresso di  $\text{HCO}_3^-$ .

L'ipossia e HIF-1 inducono l'espressione di vari fattori di crescita, come l'IGF2 (*insulin-like growth factor*) e il TGF (*transforming growth factor- $\alpha$* ) (Feldser D et al., 1999; Krishnamachary B et al., 2003). Questi fattori di crescita si legano ai loro recettori e attivano vie di traduzione del segnale, come quella di MAPK e PI3K, che stimolano proliferazione e sopravvivenza cellulare e, come detto prima, contribuiscono anche all'attivazione di HIF-1; questo porta ad un aumento della trascrizione dei geni target di HIF, fra cui anche quelli di IGF2 e TGF e costituisce quindi un meccanismo di segnalazione autocrina, fondamentale ad esempio nella progressione tumorale.

L'adattamento all'ipossia non comporta solo uno stimolo alla sopravvivenza, ma, in alcune situazioni, anche un'induzione dell'apoptosi. In diverse linee cellulari è stato osservata in ipossia l'attivazione della caspasi-3 e della caspasi-9 mediata da Apaf, e il rilascio del citocromo c (McClintock DS et al., 2002). Se HIF è deletato, si ha un minor tasso di apoptosi in ipossia rispetto alle cellule *wild-type* (Carmeliet P et al., 1998); l'espressione di HIF-1 $\alpha$  e di HIF-1 $\beta$  sono correlate con l'espressione di fattori pro-apoptotici, come la caspasi-3, Fas, il ligando di Fas (Volm M et al., 2000), inoltre l'ipossia inibisce l'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2, mentre induce la proteina pro-apoptotica BNip3 (*Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein*) (Bruick RK, 2000). HIF induce anche l'espressione di alcuni geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, come p53 e p21 (Carmeliet et al., 1998).

Oltre a quelli descritti finora, HIF-1 regola anche molti altri geni coinvolti in diversi processi, come l'adipogenesi (Yun Z et al., 2002), la formazione dei corpi carotidei (Kline DD et al., 2002), lo sviluppo dei linfociti B e la risposta immunitaria (Kojima H et al., 2002).

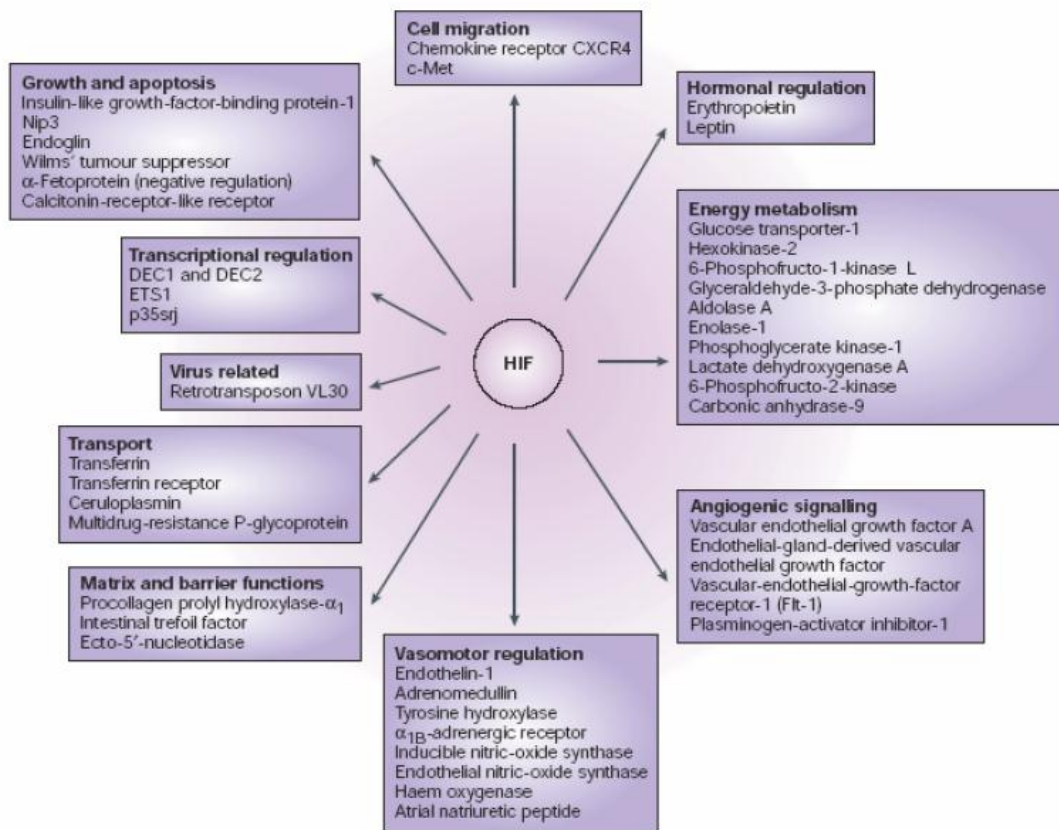


Figura 18. I principali geni bersaglio di HIF sono coinvolti in vari processi cellulari che hanno lo scopo di mantenere l'omeostasi in condizioni di ipossia.

## **RUOLO FISIOLÓGICO E PATOLOGICO DELL'IPOSSIA E DI HIF**

L'ipossia e HIF sono implicati nell'attivazione di diversi geni coinvolti nell'induzione dell'apoptosi, della crescita e della sopravvivenza cellulare, e svolgono quindi un ruolo importante nella regolazione del ciclo cellulare. Sono inoltre coinvolti nel normale sviluppo embrionale e nella fisiopatologia di moltissime malattie umane, quali l'ischemia e la progressione tumorale. Alcuni processi fondamentali nella progressione tumorale sono l'induzione del processo di angiogenesi, che garantisce un incremento del trasporto di ossigeno alle cellule, e l'attivazione della glicolisi, detto effetto Warburg (Seagroves TN et al., 2001). HIF-1 è coinvolto nell'attivazione di geni essenziali per entrambi questi processi, sia HIF-1 $\alpha$  che HIF-2 $\alpha$  hanno un ruolo nella progressione tumorale e conferiscono un vantaggio selettivo alle cellule tumorali.

### **Regolazione dell'apoptosi e del ciclo cellulare**

L'ipossia può alterare la proliferazione cellulare in due modi diversi: mediante morte cellulare programmata o arresto del ciclo cellulare.

Nelle cellule tumorali la risposta principale all'ipossia è l'apoptosi, mediata dall'attivazione della proteina p53 (Schmaltz C et al., 1998). Inizialmente si credeva che queste alterazioni fossero mediate da un'azione diretta di p53 nel processo apoptotico, ma l'attivazione di p53 avviene solo in condizioni quasi anossiche, non in ipossia. Studi successivi hanno dimostrato invece che nell'apoptosi indotta in ipossia è coinvolto HIF (Carmeliet P et al., 1998): p53 presenta due domini in grado di legare sequenze specifiche vicine e all'interno del dominio ODD di HIF-1 $\alpha$ , e questa interazione può avvenire indipendentemente dallo stato di idrossilazione. L'associazione di p53 a HIF-1 $\alpha$  porta ad una stabilizzazione e attivazione di p53 in ipossia (Suzuki H et al., 2001), quindi l'espressione di HIF-1 $\alpha$  può causare un accumulo di p53 nelle cellule ipossiche e indurre l'apoptosi attraverso l'attivazione della via di p53 (An WG et al., 1998).

Oltre all'interazione diretta con p53, HIF può regolare l'attivazione dell'apoptosi tramite p53 anche attraverso l'attivazione di Nip3, una proteina proapoptica che è in

grado di legare fattori anti-apoptotici della famiglia Bcl-2, come Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub>, bloccando la loro attività e promuovendo così l'apoptosi (Ray R et al., 2000).

Per quanto riguarda invece l'arresto delle cellule in fase G<sub>1</sub> in ipossia, ci sono dati contrastanti sugli effetti di p53: cellule mancanti di p53 mostrano un accumulo di cellule in fase G<sub>1</sub> in ipossia, ma questo effetto può essere dovuto ad un aumento di attività di HIF, piuttosto che ad un'azione diretta di p53 (Graeber TG et al., 1994).

L'arresto del ciclo cellulare invece è mediato principalmente dall'attività di alcune cinasi ciclina-dipendenti (CDK), che regolano la fosforilazione della proteina del retinoblastoma (pRb). Nello stato iperfosforilato la proteina pRb favorisce l'ingresso in fase S, mentre un accumulo di pRb nella forma ipofosforilata porta ad un arresto del ciclo cellulare e ad un accumulo delle cellule in fase G<sub>1</sub> (Knudsen E et al., 1997). L'ipofosforilazione di pRb può essere una conseguenza dell'ipossia, dovuta all'attivazione di specifiche fosfatasi (Krtolica A et al., 1998). Le due cinasi ciclina-dipendenti principalmente coinvolte nella fosforilazione di pRb sono CDK4/6 e CDK2; l'attività di queste cinasi è regolata da specifici inibitori (CKIs), la famiglia di inibitori INK4 (p15, p16, p18, p19) che inibiscono CDK 4 e 6, e la famiglia Cip/kip, che comprende p21 e p27, inibitori di CDK2. In ipossia è stato rilevato un aumento dei livelli delle proteine p21 e p27, in particolare, p27 si lega direttamente a CDK2 in condizioni ipossiche, avvalorando l'ipotesi di un legame tra l'ipossia e la regolazione del ciclo cellulare (Krtolica A et al., 1998).

Si sa ancora poco su quale sia il ruolo di HIF e di pVHL in questo arresto del ciclo cellulare in ipossia. La ciclina G2, un regolatore negativo del ciclo cellulare, in alcuni tipi cellulari è indotto in ipossia tramite l'attivazione di HIF (Bennin DA et al., 2002); anche la ciclina E, che lega CDK2 e modula la sua attività cinasica sembra essere regolata da HIF-1 (Goda N et al., 2003).

Per quanto riguarda l'induzione di p21 e p27, è stato visto che in fibroblasti embrionali murini (MEFs) mancanti di p21, p27 e Rb l'ipossia può causare comunque arresto del ciclo cellulare, dimostrando quindi che tutte queste proteine non sono necessarie per l'arresto del ciclo, almeno in questo tipo cellulare (Green S et al., 2001). Anche l'induzione di CKI è controversa, infatti alcuni studi hanno trovato una dipendenza dell'induzione di questi fattori da HIF, mentre altri hanno dimostrato una loro attivazione HIF-indipendente (Gardner L et al., 2001; Horr e N et al., 2008).

Il comportamento delle due isoforme HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  sulla regolazione del ciclo cellulare è ancora oggetto di studio: alcuni lavori hanno descritto un effetto opposto di queste due isoforme sulla regolazione del ciclo cellulare (Gordan J et al., 2007), altri lavori invece hanno trovato un'implicazione di questi due fattori nell'arresto del ciclo cellulare anche indipendentemente dall'ipossia (Hackenbeck T et al., 2009).

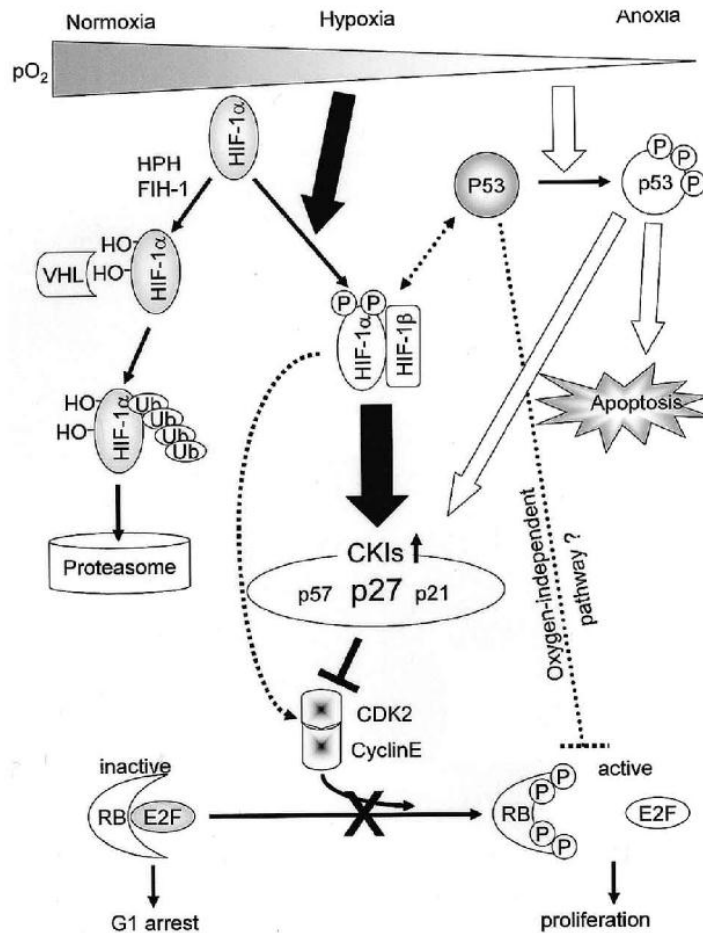


Figura 19. Regolazione del ciclo cellulare in ipossia e normossia: p53 è responsabile dell'induzione dell'apoptosi in condizioni anossiche, p21 e p27, probabilmente attivate da HIF, regolano l'arresto del ciclo cellulare in ipossia.

### Sviluppo embrionale

L'ipossia viene generalmente associata a patologie come l'ischemia, le infiammazioni e i tumori solidi, ma condizioni ipossiche possono manifestarsi anche nello normale sviluppo embrionale o nell'adulto, dove spesso creano nicchie che regolano il differenziamento cellulare.

I componenti del sistema di HIF svolgono un ruolo essenziale nello sviluppo embrionale, il *knockout* di HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  comportano un'alterazione dello sviluppo vascolare e mortalità nel topo. Embrioni mancanti di HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha^{-/-}$ ) muoiono all'undicesimo giorno di sviluppo per mancanza di formazione dei vasi sanguigni, formazione alterata della cresta neurale e malformazioni cardiovascolari (Iyer NV et al., 1998; Ryan HE et al., 1998). Topi eterozigoti con un solo allele di HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha^{+/-}$ ) si sviluppano normalmente, ma hanno risposte alterate quando si trovano in condizioni di ipossia cronica (Yu AY et al., 1999). L'inattivazione di HIF-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha^{-/-}$ ) comporta fenotipi piuttosto diversi: gli embrioni di topo muoiono per un'inadeguata fusione e rimodellamento dei vasi sanguigni, incompleta maturazione dei polmoni e un'insufficienza di produzione delle catecolamine (Peng J et al., 2000; Tian H et al., 1998). Perciò sembra che HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  abbiano funzioni non ridondanti nella regolazione dell'espressione genica durante lo sviluppo embrionale. Anche gli embrioni HIF-1 $\beta^{-/-}$  muoiono per difetti nello sviluppo vascolare e nell'angiogenesi (Maltepe E et al., 1997).

## **Cancro**

L'ipossia è una caratteristica rilevante nella progressione tumorale, può essere attribuita ad una diminuita densità capillare o ad una disorganizzazione dei vasi intorno alle cellule tumorali.

In molti tumori umani è stata descritta un'overespressione di HIF-1 $\alpha$  e di HIF-2 $\alpha$ , come conseguenza dell'ipossia intratumorale o causata da alterazioni genetiche (Zhong H et al., 1999),

L'overespressione di HIF-1 $\alpha$  nei tumori è spesso associata ad una maggiore aggressività. Al crescere delle dimensioni della massa tumorale, l'ambiente al suo interno diventa sempre più ipossico, finché non vengono creati nuovi vasi sanguigni. Le condizioni ipossiche del tumore permettono un aumento della stabilità e dell'attività di HIF-1: nei tumori benigni ci sono già livelli rilevabili della proteina HIF-1 $\alpha$ , che diventano elevati nei tumori maligni primari, e ancora più marcati nelle metastasi, mentre la proteina è praticamente assente nei tessuti normali (Zhong H et al., 1999).

Un'elevata percentuale delle alterazioni genetiche che caratterizzano le cellule tumorali è associata ad un aumento dell'espressione di HIF-1 $\alpha$ : ad esempio nella malattia di VHL, la perdita di funzione della proteina pVHL provoca un'espressione

costitutiva di HIF-1 $\alpha$  (Iliopoulos O et al., 1996). La perdita della forma *wild-type* di p53, che è inattivata nella maggior parte dei tumori umani, causa un incremento dei livelli di HIF-1 $\alpha$  e un aumento della trascrizione HIF-dipendente (Ravi R et al., 2000). Anche la perdita della proteina oncosoppressore PTEN nelle cellule di glioblastoma provoca un incremento dei livelli di HIF-1 $\alpha$  e dell'espressione genica da esso mediata, probabilmente tramite l'attivazione della cascata del segnale di PI3K/AKT (Zundel W et al., 2000). L'oncogene v-Src deve probabilmente la sua capacità di indurre trasformazione cellulare all'attivazione di HIF (Jiang BH et al., 1997). Infine, in alcuni casi di tumore al seno, si riscontra un'alterazione del recettore HER2 che causa una sua più intensa segnalazione, questa alterazione, che è associata ad una maggior aggressività del tumore, provoca un incremento della sintesi di HIF-1 $\alpha$  (Laughner E et al., 2001).

Sembra quindi che l'overespressione di HIF-1 conferisca un vantaggio selettivo alle cellule tumorali, spesso inoltre è correlata a una maggior mortalità, e alla resistenza ai trattamenti.

### **Ischemia**

L'attivazione di HIF è coinvolta in varie risposte fisiologiche, ad esempio in caso di ischemia, ipossia o infiammazioni, dove svolge un ruolo essenziale nel rispondere al danno di un organo o di un tessuto. Ad esempio i livelli di HIF e del VEGF sono aumentati nel miocardio in pazienti che presentano occlusione delle coronarie (Lee SH et al., 2000) e il rimodellamento vascolare in seguito ad ischemia coinvolge l'espressione genica HIF-dipendente. In modelli di ischemia del miocardio o del cervello, su pecora o ratto, è stato dimostrato un aumento dell'espressione di HIF e dei geni indotti da esso (Martin C et al., 1998; Bergeron M et al., 1999).

## **RISPOSTE ALL'IPOSSIA INDIPENDENTI DA HIF**

Quando una cellula è esposta a basse tensioni di ossigeno, viene messa in atto una risposta coordinata, basata principalmente sulla regolazione dell'espressione genica. Questa regolazione è mediata non solo dall'attivazione trascrizionale, ma anche dalla modulazione della traduzione proteica. La traduzione è un processo cellulare che richiede molta energia, perciò è uno dei primi ad essere ridotto in condizioni di scarsa produzione di energia, come l'ipossia. Anche la replicazione del DNA è un processo che richiede una grande quantità di energia e perciò anch'esso è modulato in base alla tensione di ossigeno. Queste regolazioni sono prevalentemente HIF-indipendenti, anche se HIF può contribuire in diversi modi alla risposta cellulare finale.

### **Regolazione della sintesi proteica**

La riduzione della traduzione e della sintesi proteica sono state osservate prevalentemente in condizioni di tensione di ossigeno molto bassa, quasi anossiche (0,5-0,0%) (Koritzinsky M et al., 2005), però è stato visto che anche una percentuale di ossigeno meno bassa (1-5%) può causare gli stessi effetti, sebbene con cinetica diversa (Liu L et al., 2006).

La sintesi proteica è un processo complesso e può essere diviso in tre principali passaggi: inizio, allungamento e terminazione, che rappresentano altrettanti punti di regolazione.

Negli eucarioti l'inizio è il passaggio più complesso ed è controllato dai fattori di inizio eIFs (*eukaryotic initiation factors*). L'inizio della traduzione prevede il legame al cap 5' dell'mRNA del complesso attivo eIF-4F, formato dai fattori eIF-4E (che lega il cap in 5'), eIF-4G (proteina *scaffold*) e eIF-4A (elicasi ATP-dipendente). Questa interazione rende possibile il reclutamento del complesso di pre-inizio 43S, che comprende la subunità ribosomiale 40S, il complesso ternario (eIF-2-GTP-Met-tRNAi) e altri fattori di inizio (Sonenberg N et al., 2003); una volta assemblato, questo complesso scorre sull'mRNA, partendo dalla regione UTR al 5', finché non trova il codone di inizio AUG, il fattore di inizio a questo punto viene rilasciato e si ha il reclutamento della subunità ribosomiale 60S, che permette l'avvio della fase di allungamento della traduzione.

Il complesso eIF-4F e il complesso ternario costituiscono i due principali punti di regolazione nell'inizio della traduzione: ad esempio, esiste una famiglia di proteine che legano eIF-4E (4E-BPs, *eIF-4E binding protein*) e competono con eIF-4G, impedendo così la formazione del complesso eIF-4F e quindi l'inizio della traduzione. L'associazione di queste 4E-BPs con il fattore eIF-4E è regolata per fosforilazione, mediata principalmente da mTOR (*mammalian target of rapamycin*). mTOR è una Ser/Thr cinasi, che risponde a diversi stimoli, quali le variazioni dello stato energetico, la disponibilità di nutrienti, l'insulina e vari fattori di crescita, la sua attività è associata alla progressione del ciclo e alla crescita cellulare; mTOR fosforila le proteine 4E-BPs, riducendo così la loro affinità per eIF-4E, rende perciò possibile il legame con eIF-4G e favorisce l'inizio della traduzione proteica. mTOR attiva anche la S6 cinasi (S6K), che stimola la traduzione fosforilando la proteina ribosomiale S6 e favorendo il reclutamento di eIF-4B. In ipossia l'attività di mTOR è inibita, si ha quindi ipofosforilazione di S6K e di 4E-BP1 (Liu L et al., 2006). Il meccanismo di inibizione di mTOR non è ancora molto chiaro, ma dai dati presenti fino ad oggi sembra che l'ipossia, provocando un abbassamento dello stato energetico cellulare, porti all'attivazione della cinasi AMP dipendente (AMPK), questa fosforila il complesso TSC (*tuberous sclerosis complex*) 1/2, che inibisce l'attività di mTOR. Un'altra ipotesi è che mTOR sia regolato dalla proteina REDD1, questa è indotta in ipossia in maniera HIF-dipendente, attiva il complesso TSC1/2, che a sua volta inibisce mTOR (Schwarzer R et al., 2005).

L'ipossia può anche indurre l'iperfosforilazione della Ser51 sulla subunità  $\alpha$  di eIF2, questo impedisce lo scambio di GDP con GTP e inibisce quindi la traduzione. Questa fosforilazione può essere mediata da diverse cinasi, tutte sensibili ad eventi di stress, ma sembra che la responsabile della fosforilazione di eIF2 $\alpha$  indotta dall'ipossia sia PERK (*double-stranded RNA-activated protein kinase like-ER kinase*) (Blais JD et al., 2006) (*fig.20*).



L'espressione dei miRNA è indotta dagli stessi fattori di trascrizione che regolano l'espressione dei geni classici. In ipossia, HIF sembra svolgere un ruolo determinante nell'induzione dei miRNA, almeno per quello che riguarda miR-210 (*fig.21*): ad esempio, nelle cellule di carcinoma renale è stato visto che l'induzione in ipossia di miR-210 è dipendente dal gene oncosoppressore VHL, che regola la stabilità di HIF, inoltre nelle cellule MCF7, il silenziamento di HIF-1 o HIF-2 annulla l'induzione di miR-210 in ipossia (Kulshreshtha R et al., 2007). Nelle cellule endoteliali invece la situazione è più complessa: il silenziamento di HIF-1 $\alpha$  blocca l'induzione di miR-210, mentre il silenziamento di HIF-2 $\alpha$  sembra non influenzare l'espressione di miR-210, ipotizzando quindi una potenziale specificità delle isoforme di HIF in alcuni sistemi cellulari (Fasanaro P et al., 2008).

L'induzione di miR-210 mostra una dinamica marcatamente diversa rispetto a quella di HIF, infatti l'espressione del miRNA continua ad aumentare anche dopo che si è raggiunto il picco di espressione di HIF.

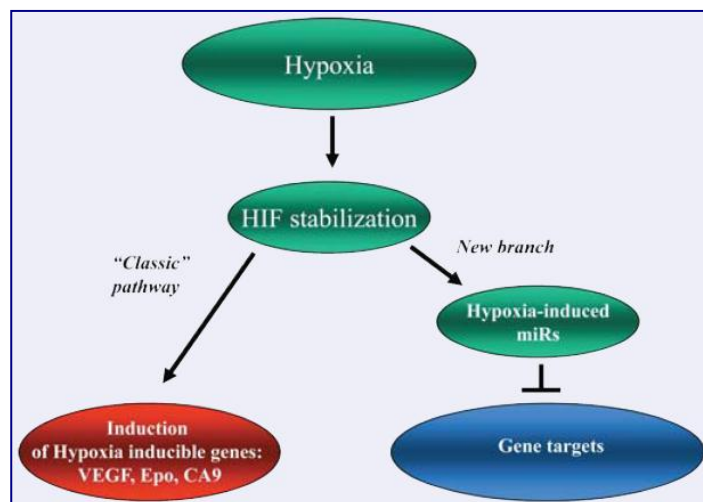


Figura 21. Oltre ai geni attivati direttamente da HIF, la risposta all'ipossia attiva l'espressione di miRNA, che a loro volta regolano l'espressione di specifici geni.

I primi indizi sui geni che potrebbero essere bersaglio di miR-210 sono stati ottenuti da un'analisi computazionale in *Drosophila*: sono stati predetti più di 70 geni, che per lo più appartengono alla classe dei recettori tirosino-cinasi (Grün D et al., 2005). Per il miR-210 umano, invece, le ricerche hanno indicato un ampio spettro di

geni candidati, che includono geni coinvolti nella proliferazione, riparazione del DNA, rimodellamento della cromatina, metabolismo e migrazione cellulare (Kulshreshtha R et al., 2007; Camps C et al., 2008).

Recentemente stanno emergendo i primi dati sperimentali su geni bersaglio di miR-210: ad esempio è stata identificata l'efrina A3 come bersaglio di miR-210 in condizioni ipossiche (Fasanaro P et al., 2008), un'inattivazione di questo miRNA nelle cellule HUVEC diminuisce la loro capacità di formare capillari e di migrare in risposta al VEGF, l'inibizione di EFNA3 sembra perciò essere necessaria per la stimolazione della tubulogenesi mediata da miR-210. Un altro bersaglio di miR-210 identificato da analisi computazionali e poi confermato da analisi sperimentali è il fattore di trascrizione E2F3 (*E2F transcription factor 3*), che gioca un ruolo centrale nella controllo del ciclo cellulare (Aslanian A et al., 2004).

### **Stress replicativo**

Un altro processo biologico che richiede molta energia è la replicazione del DNA, questa inizia quando il complesso ORC (*origin recognition complex*) si lega al DNA, recluta il complesso dell'elicasi (Mcm2-7), le polimerasi e altri cofattori necessari alla sintesi del nuovo filamento. E' di importanza vitale per la cellula che questo evento sia strettamente controllato e regolato, in quanto errori nella replicazione del DNA possono causare grossi danni e portare a mutazioni maligne; le cellule hanno perciò diversi *check point* durante la fase S, che permettono di bloccare la forza replicativa e di correggere eventuali danni del DNA. Una volta riconosciuto un problema, vengono attivate delle specifiche cinasi, dette ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) e ATR (*ATM and Rad3 related*), queste avviano una serie di eventi che portano all'arresto del ciclo cellulare, alla riparazione del DNA e/o all'apoptosi.

La maggior parte degli studi sullo stress replicativo indotto dall'ipossia sono stati condotti in condizioni quasi anossiche, comunque, anche altri valori di ossigeno possono indurre un arresto al passaggio dalla fase G1 alla S (Hammond EM et al. (a), 2003; Gibson SL et al., 2005). Nei primi studi sullo stress replicativo indotto in ipossia, furono identificate molte similitudini fra l'ipossia e altri stress come l'afidicolina e l'idrossiurea: tutti questi tipi di stress infatti inducono l'attivazione di ATR e della sua proteina bersaglio, la Chk1 (*checkpoint kinase 1*); l'ipossia induce anche la fosforilazione di diversi altri bersagli di ATR, come l'istone 2A, H2A.X, Rad17 e p53 (Hammond EM et al., 2003 (a); Hammond EM et al., 2003 (b)).

Il meccanismo di questo blocco della replicazione in ipossia non è stato ancora ben delucidato, ma è chiaro che si tratta di un'inibizione dell'inizio della replicazione, che non sembra influenzare invece i punti di replicazione già attivi.

Utilizzando tempi di esposizione all'ipossia più lunghi, sono stati identificati nella risposta ipossica anche ATM e Chk2: ATR e ATM si attivano l'un l'altro, e ATR attiva Chk2, quindi l'attivazione tardiva di queste due proteine può essere dovuta dall'attivazione precoce di ATR (Wang XQ et al., 2006).

### **Modificazioni epigenetiche**

La risposta cellulare all'ipossia è principalmente mediata dalla trascrizione, ma perchè questa avvenga, i fattori di trascrizione devono potersi legare alle sequenze promotore o *enhancer* dei geni, che possono essere inaccessibili se contenute all'interno di strutture compatte della cromatina.

Ci sono tre diversi modi di variare la struttura della cromatina: il rimodellamento dei nucleosomi, le modificazioni covalenti degli istoni, o la sostituzione di uno o più istoni con varianti istoniche. Il rimodellamento dei nucleosomi è mediato da una famiglia di enzimi ATP-dipendenti, ad esempio il complesso SWI/SNF (il nome deriva dal *mating type* del lievito in cui sono state scoperte), questo provoca uno spostamento del nucleosoma dal DNA e permette il legame dei fattori di trascrizione (Varga-Weisz PD et al., 2006). Le modificazioni covalenti degli istoni comprendono metilazioni, fosforilazioni, acetilazioni, sumoilaizioni e ubiquitinazioni ad opera di diversi enzimi; queste modificazioni cambiano la struttura della cromatina e facilitano il reclutamento di altri fattori, nella maggior parte dei casi, la cromatina trascrizionalmente attiva è quella in forma più acetilata (Shilatifard A, 2006). Le varianti istoniche aggiungono un ulteriore livello di controllo epigenetico, ad esempio, possono bloccare la forza replicativa in caso di danno al DNA (Jin J et al., 2005).

Le variazioni della struttura cromatinica hanno una grande importanza nella regolazione dell'espressione genica in condizioni di bassa tensione di ossigeno: ad esempio, il principale cofattore di HIF, p300, ha attività istone-acetiltransferasica; diversi studi hanno dimostrato anche l'interazione di HIF-1 con la istone-deacetilasi HDAC7, necessaria per l'attivazione del fattore di trascrizione (Kato H et al., 2004). Inoltre è stato dimostrato che il complesso SWI/SNF è necessario per l'induzione mediata dall'ipossia di EPO (Wang F et al., 2004).

Si sa ancora molto poco comunque su quali siano i meccanismi che modificano la struttura della cromatina in ipossia per permettere la trascrizione, inoltre rimane ancora da chiarire come la funzione pro-apoptotica di HIF sia repressa nelle cellule tumorali. Uno studio recente dimostra che il gene pro-apoptotico BNIP3 (*Bcl2/adenovirus E1B 19kDa interactin protein 3*), bersaglio di HIF, nelle cellule del cancro colonrettale, sia silenziato mediante de-acetilazione e metilazione (Bacon AL et al., 2004).

# **MATERIALI E METODI**

## **Materiali**

Se non specificato diversamente tutti i reagenti sono Sigma.

Il PDGF-BB ricombinante umano è stato acquistato alla Peprotech, la membrana di PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) usata per il Western Blot e il kit di chemi-luminescenza alla Millipore, gli anticorpi sono della Santa Cruz, tranne gli anti-fosfo-ERK della Biolabs e gli anti-fosfo-tirosina (4G10) della Upstate Biotechnology.

Gli inibitori farmacologici Filipina e Nistatina provengono dalla Fluka, gli inibitori di Rac1 (NSC23766) e di ROCK (Y-27632) dalla Calbiochem; il reagente BCA e la sulfon-NHS-SS-biotina sono Pierce, il kit per il dosaggio di Rho (Rhotekin RDB, agarosio) è della Upstate Biotechnology.

I fibroblasti murini NIH3T3 provengono dalla ECACC (*European Collection of Cell Cultures*), le A375 e Hs29 dalla ATCC (*American Type Culture Collection*) le UDEAs sono linee primarie ottenute da espianiti umani. La lipofectamina, il CFSE, il kit TRIZol per l'estrazione dell'RNA e i primer per RealTime PCR sono Invitrogen, i siRNA per la dinamina2, per HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  sono Qiagen.

## **Colture cellulari**

Le cellule sono state coltivate in terreno di crescita DMEM (*Dulbecco Eagle's Modified Medium*) addizionato con glutammina 2mM, penicillina (100 U/ml), streptomcina (100  $\mu$ g/ml) e siero di vitello (*calv*) BCS al 10%, per le NIH3T3, o siero fetale bovino (FCS) al 10% per le A375, Hs29 e le UDEAs. Le piastre sono state mantenute in incubatore ad una temperatura di circa 37° C e in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Arrivate ad un 80-90% di confluenza le cellule sono state passate in sottoculture. Periodicamente uno stock di cellule è stato conservato mediante congelamento in azoto liquido in una soluzione costituita da terreno completo e dimetil-solfossido (DMSO) al 10%.

Le cellule sono state manipolate sotto cappa a flusso laminare verticale, tutte le soluzioni e il materiale impiegato per le colture cellulari è stato sterilizzato prima dell'uso: le soluzioni per filtrazione, la vetreria in stufa a 180° C, il materiale in teflon, silicone e policarbonato e l'acqua in autoclave.

## **Stimolazione e lisi cellulare**

Le cellule sono state piastrate in numero di circa 1x10<sup>6</sup> in DMEM con siero al 10%, nell'incubatore al 20% di ossigeno o in quello da ipossia all'1% di ossigeno, lasciate

crescere fino ad una confluenza massima del 50-60%, poi starvate in terreno senza siero 24 ore prima della stimolazione. Il PDGF BB, usato nella maggior parte delle stimolazioni, è stato inizialmente sciolto in acqua bidistillata sterile, ad una concentrazione finale di 10 ng/ $\mu$ l. La stimolazione è stata bloccata con PBS freddo (4°C) e le cellule lisate in piastra o direttamente con Sample Buffer (tris HCl pH 6,8 0,5M, SDS 2%, mercaptoetanolo 5%, glicerolo 10%, blu di bromofenolo) o con RIPA Buffer (Tris-HCl pH 7.5 50 mM, NaCl 150 mM, NaF 100 mM, EGTA 1mM, Nonidet P-40 1%, NaN<sub>3</sub> 0,02%, ortovanadato 1 mM, sodiodeossicolato 0,5%, SDS 0,1%, 1  $\mu$ g/ml di aprotinina, 1  $\mu$ g/ml leupeptina). In questo caso i lisati sono stati centrifugati, per eliminare i detriti cellulari, e immunoprecipitati per 4 ore a 4°C con 0,1  $\mu$ g dell'anticorpo specifico. Gli immunocomplessi sono stati fatti reagire con la proteina A-Sefarosio (Sigma), poi denaturati con 15  $\mu$ l di Sample Buffer.

Negli esperimenti con gli inibitori farmacologici, questi sono stati usati con concentrazioni di 12,5 mg/ml, per la Nistatina, e 0,25 mg/ml, per la Filipina, e aggiunti direttamente nel terreno di starvazione delle piastre 1 ora prima dell'esperimento.

### **SDS-PAGE e Western Blot**

Per analizzare i campioni, le proteine sono state separate mediante elettroforesi SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). La tecnica elettroforetica si basa sull'applicazione di una differenza di potenziale, che genera un campo elettrico all'interno del quale migrano le biomolecole. Nell'SDS-PAGE i campioni vengono caricati su un gel poliacrilammide, questo costituisce una matrice macromolecolare che consente il trasporto delle molecole; il sodio dodecil solfato (SDS) è un detergente anionico, denatura le proteine e conferisce loro una carica negativa proporzionale alla lunghezza, in modo che la migrazione nel campo elettrico sia determinata dal loro peso molecolare.

I campioni sono stati caricati su un gel di poliacrilammide, formato da un *separating gel* (acrilammide 8%-12%, Tris HCl pH 8,8 0,25M, SDS 1%, ammonio-persolfato 0,05%, temed 0,05%), e da uno *stacking gel* (Tris HCl pH 6,8 0,125 M, SDS 1%, ammonio-persolfato 0,05%, temed 0,1%) e fatti correre in tampone di corsa TRIS/glicina/SDS a 200 V per circa 1 ora.

In seguito alla corsa elettroforetica, le proteine separate sul gel sono state trasferite mediante Western Blot su una membrana di PVDF. Il Western Blot è una tecnica che

permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici.

La membrana di PVDF viene attivata prima del trasferimento, tramite un'idratazione in metanolo al 100% per circa 1 minuto e poi un'equilibratura in tampone di trasferimento per 5 minuti. Il trasferimento viene effettuato applicando un campo elettrico di 100 V per 1 ora, usando un tampone di trasferimento (glicina 192mM, Tris HCl 25mM pH 8,3, con metanolo al 10%), in agitazione e a freddo.

Dopo il trasferimento, le membrane sono state incubate in una soluzione contenente albumina di siero bovino all'1%, Tris/HCl pH 7.5 10 mM, EDTA 1 mM e Tween-20 0.05%, per 1 ora a temperatura ambiente. Le membrane sono state incubate con specifici anticorpi primari, per 1 ora a temperatura ambiente o *overnight* a 4°C, in PBS addizionato con BSA all'1% e Tween-20 allo 0,05%, poi con anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano. Dopo il trattamento con gli anticorpi primari e secondari le membrane sono state lavate in una soluzione di PBS con Tween-20 allo 0,1%, e sviluppate con il kit di Chemiluminescenza (*Enhanced Chemi-Luminescence kit*). La chemiluminescenza è stata rilevata con il sistema per immagini Gel-Logic 2200 (Kodak) e le analisi quantitative delle bande sono state fatte con il software Kodak MI.

In alcuni casi la membrana è stata utilizzata per riconoscere più proteine, è stata utilizzata una soluzione di *stripping*, in agitazione a 37° C per 3 ore, poi le membrane sono state riequilibrata con la soluzione di BSA per un'ora, e incubate con nuovi anticorpi primari.

### **Pull down assay**

Il dosaggio della quantità di Rho e Rac attive è stato fatto mediante *pull down assay*: le cellule sono state stimolate e trattate come descritto prima, poi ai lisati in cRIPA sono stati aggiunti 10 µl della proteina Rhotekin RDB agarosio (per Rho) o della PAK-CRIB-GST agarosio (per Rac). I campioni sono stati tenuti per 1 ora a 4°C, denaturati con 15 µl di Sample Buffer e analizzati mediante elettroforesi SDS-PAGE e Western Blot come descritto prima.

### **Determinazione della concentrazione proteica**

Per quantificare la concentrazione proteica del lisati cellulari è stato utilizzato il metodo colorimetrico del BCA (acido bicincononico) *Protein assay Reagent*. Il reattivo è

costituito da una soluzione contenente  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , il reagente acido bicincononico e il tartrato di  $\text{NaOH}$  0,1M, che viene miscelato in rapporto 50:1 con  $\text{CuSO}_4$  al 4%. Per ogni campione un'aliquota del lisato cellulare è stata aggiunta alla soluzione di reazione per un volume finale di 1 ml. Questo metodo si basa sulla capacità delle proteine di ridurre, in ambiente alcalino, gli ioni  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ . Gli ioni  $\text{Cu}^{1+}$  vengono successivamente chelati da due molecole di acido bicincononico (BCA), sviluppando un colore porpora con un massimo di assorbimento a 562 nm.

I campioni sono stati incubati il reagente a 60° C per 30 minuti, dopodiché è stato letto l'assorbimento dei campioni a una lunghezza d'onda di 562 nm allo spettrofotometro. La concentrazione proteica dei campioni viene ricavata per confronto con una curva standard, ottenuta con albumina bovina sierica (BSA).

### **Test di vitalità con Crystal Violetto**

Sono state piastrate  $5 \times 10^5$  cellule NIH3T3 in piastre di diametro 60 mm, quindi sono state starvate 24 ore prima di essere stimolate con la concentrazione desiderata di PDGF per 24 o 48 ore. La crescita è stata bloccata rimuovendo il terreno e aggiungendo nelle piastre una soluzione di Crystal Violetto allo 0,5% e metanolo al 20%; dopo 5 minuti, le cellule fissate sono state lavate con PBS e solubilizzate con 1 ml della soluzione isotonica di citrato di sodio 0,1 M a pH 4,2. Dopo 1 ora a 4° C, la soluzione è stata prelevata dalle piastre e letta allo spettrofotometro a 595 nm.

Il Crystal Violetto è un colorante che penetra solo nelle cellule vive e ha un picco di assorbimento a 595 nm, questo permette di valutare la quantità di cellule presenti in una coltura semplicemente misurando l'assorbanza del colorante assorbito.

### **Test di proliferazione cellulare con CFSE**

Il test di crescita è stato effettuato utilizzando la marcatura con CFSE (*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) e la successiva analisi citofluorimetrica.

Sono state piastrate  $5 \times 10^5$  cellule NIH3T3 in piastre di diametro 60 mm, quindi starvate 24 ore prima di essere trattate con il CFSE, diluito in PBS ad una soluzione 1,6  $\mu\text{M}$ . Le cellule sono state marcate con 1 ml di PBS con la sonda per 15 min a 37°C, dopodiché sono state rimesse in terreno a 37°C per almeno 30 min. I campioni sono stati preparati staccando le cellule, centrifugandole e fissandole con paraformaldeide al 3% in PBS,

per 15 min a temperatura ambiente. Le cellule sono state poi risospese in PBS e analizzate al citofluorimetro.

Il CFSE è un colorante che diffonde passivamente all'interno delle cellule e si lega covalentemente ai gruppi amminici delle proteine; le esterasi citoplasmatiche rimuovono i gruppi carbossilici di questa molecola, convertendola nella sua forma fluorescente (Exmax: 496nm; Emmax: 512nm), che non è più in grado di fuoriuscire dalla cellula. Ad ogni divisione cellulare le proteine marcate si distribuiscono equamente nelle due cellule figlie, quindi il colorante diminuisce di concentrazione e d'intensità. L'analisi citofluorimetrica della fluorescenza emessa e la rielaborazione dei dati con il software ModFit permettono di ricavare il numero di divisioni e l'indice di proliferazione cellulare.

### **Analisi Citofluorimetriche**

Le analisi citofluorimetriche sono state utilizzate per determinare il contenuto di DNA cellulare e studiare il ciclo cellulare.

Le cellule sono state piastrate in numero di  $10^5$  in piastre da 60 mm, starvate per 24 ore e stimolate per tempi variabili con 0, 1, 5, 30 ng/ml di PDGF-BB. Dopo il tempo stabilito di stimolazione le cellule sono state lavate in PBS e lisate con 0,6 ml di una soluzione di 50 µg/ml di ioduro di propidio, in Na-citrato 0,1% e NP40 0,1%. I campioni sono stati analizzati con un citofluorimetro a flusso Becton-Dickinson FACscan con laser ad argon a 488 nm e filtro in emissione a ~ 600 nm, e analizzati con il software di analisi FacsDiva e ModFit.

Lo ioduro di propidio è un intercalante del DNA, si lega in maniera stechiometrica e permette una quantificazione del contenuto cellulare di DNA, in questo modo è possibile stabilire la percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo, le cellule in fase G2 hanno un contenuto di DNA doppio rispetto a quelle in G1 e le cellule in fase S un contenuto di DNA intermedio tra quello delle due fasi.

### **Test di *Wound Healing***

Il test di *wound-healing* mima la risposta fisiologica dei fibroblasti alla formazione di una ferita. Le cellule sono state piastrate e lasciate crescere fino a confluenza, quindi sono state starvate e dopo 24 ore è stata rimossa una striscia di cellule nella parte centrale, con l'uso di una punta sterile. Le cellule sono state stimolate con le

concentrazioni desiderate di di PDGF BB e lasciate crescere in incubatore. Dopo 17 ore, le cellule migrate nella zona centrale sono state osservate al microscopio e contate.

### **Test bi-dimensionale di migrazione e proliferazione**

La migrazione laterale e la proliferazione delle cellule in adesione è stata valutata usando un anello di silicone secondo una tecnica riportata precedentemente (Parenti A et al., 1996). Nelle piastre è stato posto un anello di silicone a delimitare un'area vuota centrale, le cellule sono state piastrate all'interno di questa area vuota, lasciate crescere fino a confluenza e starvate per 24 ore. Prima della stimolazione l'anello è stato rimosso ed è stato tracciato un segno sul fondo della piastra per delimitare il confine delle cellule a confluenza. Quindi le cellule sono state stimulate con PDGF o con siero al 10% e lasciate crescere per 24 ore. La quantificazione della migrazione cellulare è stata fatta: a) misurando al microscopio la distanza del fronte di migrazione (ovvero le cellule più lontane) dalla linea di partenza; b) contando il numero di cellule all'interno di ogni grid unit ( $225 \mu\text{m} \times 225 \mu\text{m} = 1$  grid unit) in funzione della distanza dall'origine.

### **Trasfezioni con siRNA**

Le trasfezioni transienti sono state eseguite utilizzando come vettore la Lipofectamina (Invitrogen) e siRNA specifici per il gene di interesse (dinamina, HIF-1 $\alpha$  o HIF-2 $\alpha$ ), diretti alle seguenti sequenze target:

Dinamina: 5'-CTGCCTCTGTATATCCTATTA-3';

5'-CTGGCTCAAGTTGTATATATA-3'.

HIF-1 $\alpha$ : 5'-CCGCTCAATTTATGAATATTA-3'

HIF-2 $\alpha$ : 5'-TGGGTTTGCGATAACCAATCAA-3'

Cellule NIH3T3 sono state piastrate in numero di circa  $5 \times 10^5$  in piastre di diametro 60 mm e trasfettate quando avevano raggiunto una confluenza del 50-70%. La miscela di trasfezione per ogni piastra è costituita da 2,5  $\mu\text{l}$  di lipofectamina e 100 pmoli di siRNA in 1 ml di terreno senza antibiotici. Dopo 4 ore dalla trasfezione le cellule sono state messe nuovamente in terreno completo. Le cellule sono state utilizzate per gli esperimenti tre giorni dopo la trasfezione.

### **Real-Time PCR**

La Real-Time PCR è stata utilizzata per misurare la quantità di mRNA dei geni di interesse. L'RNA totale è stato estratto dalle cellule utilizzando il kit TRIzol

(Invitrogen), quindi è stata effettuata la trascrizione inversa in c-DNA usando esameri casuali e la trascrittasi inversa MMLV. Il c-DNA è stato analizzato mediante Real-Time PCR per l'espressione dei gene PDGF-R e HIF-1 $\alpha$ , utilizzando i seguenti primers:

PDGF-R Forward: 5'-GAGCTCAGTGAGAGGAAGCGTATC-3'

PDGF-R Reverse: 5'-CTCGGAGTCCATAGGGAGGAA-3'

HIF-1 $\alpha$  Forward: 5'-CAACGTGGAAGGTGCTTCA- 3'

HIF-1 $\alpha$  Reverse: 3'-TGAGGTTGGTACTGTTGGTATCA- 5'

I livelli di espressione del gene in esame sono stati normalizzati sulla  $\beta$ -actina di topo (ACTB). Le reazioni sono state eseguite in un volume totale di 20  $\mu$ l, contenente 4  $\mu$ l di cDNA, 1  $\mu$ l di *primer forward*, 1  $\mu$ l di *primer reverse* e il tampone incluso nella master-mix. I cicli di PCR sono stati eseguiti con un primo step di denaturazione a 95°C per 10 minuti, 40 cicli di 1 minuto di denaturazione a 95°C e 1 minuto di *annealing* ed estensione a 60°C.

### **Test di internalizzazione del PDGF-R**

L'internalizzazione del PDGF-R è stata determinata secondo un protocollo descritto precedentemente (Roberts S et al., 2001). Le cellule sono state starvate 24 ore, poi marcate con 0,2 mg/ml di sulfo-NHS-SS-biotina (Pierce) in PBS per 45 minuti in ghiaccio, quindi sono state incubate per 10 min in ghiaccio con una soluzione Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, per eliminare la biotina non legata. Le cellule sono state pre-riscaldate a 37°C per 5 minuti e poi stimolate con 2, 5 o 30 ng/ml di PDGF per i tempi indicati. La biotina è stata rimossa dalle proteine presenti sulla superficie cellulare con una soluzione di sodio-2-mercaptoetansulfonato 20 mM in Tris 50 mM, pH 8,6, NaCl 100 mM, per 2 minuti in ghiaccio. Il sodio-2-mercaptoetansulfonato è stato inattivato aggiungendo una soluzione di acido iodacetico 20 mM in PBS per 10 minuti in ghiaccio, poi le cellule lisate in cRIPA come descritto precedentemente. I lisati sono stati chiarificati per centrifugazione a 10.000 x g per 20 minuti, quindi le proteine biotinilate sono state precipitate con la resina streptavidina-agarosio. I precipitati sono stati denaturati in 15  $\mu$ l di Sample Buffer e analizzati mediante elettroforesi SDS-PAGE e Western Blot.

# **PARTE SPERIMENTALE**

## PREMESSA

Il nostro lavoro è stato focalizzato sullo studio del comportamento fisiologico cellulare, attraverso l'analisi delle risposte cellulari indotte da variazioni di parametri ambientali o di fattori proteici presenti nel mezzo circostante. In particolare, abbiamo studiato il comportamento cellulare dei fibroblasti, le cellule tipiche e più numerose del tessuto connettivo, responsabili, fra le altre cose, della produzione dei componenti della matrice extracellulare, della riparazione dei tessuti in seguito a lesione o danno tissutale e dei fenomeni di fibrosi.

Come modello sperimentale abbiamo scelto i fibroblasti murini NIH3T3. Questi fibroblasti rappresentano una linea immortalizzata stabilita nel 1962 dagli scienziati George Todaro e Howard Green, dell'Università di Medicina di New York. Le NIH3T3 costituiscono un buon modello sperimentale di fibroblasti perché sono cellule immortalizzate ma non trasformate, quindi sono dipendenti dal siero, crescono solo in adesione ad un substrato e risentono dell'inibizione da contatto, comportandosi quindi in modo molto simile ai fibroblasti presenti nell'organismo.

I fibroblasti sono sensibili a vari fattori di crescita normalmente presenti nell'organismo, quali il *fibroblast growth factor* (FGF), il *platelet-derived growth factor* (PDGF), e l'acido liso-fosfatidico (LPA); le principali risposte fenotipiche indotte da questi fattori sono la proliferazione, l'inibizione dell'apoptosi e la migrazione.

Nei nostri esperimenti le NIH3T3 sono state stimulate con PDGF, questo esiste in forma dimerica e abbiamo scelto di usare l'isoforma BB, che è in grado di attivare tutte e tre le isoforme di recettore (PDGF-R  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ ,  $\alpha\beta$ ).

Nel primo caso abbiamo studiato due risposte fenotipiche che possono essere indotte dallo stesso stimolo, ma che sono opposte e mutuamente esclusive. Il PDGF infatti è in grado di indurre, nei fibroblasti come in altre cellule, sia la migrazione che la proliferazione cellulare, ma ovviamente in ogni singola cellula queste due azioni non possono avvenire nello stesso momento. Dal nostro lavoro è emerso come il discriminante fra le due risposte cellulari sia la concentrazione di ligando percepita dalla cellula; ogni singola cellula si comporta diversamente in base alla concentrazione di ligando percepita istantaneamente nel mezzo circostante e potrà variare la risposta fenotipica in seguito a variazioni di tale concentrazione.

Nel secondo caso abbiamo analizzato invece le risposte fisiologiche dei fibroblasti in funzione della tensione di ossigeno presente nell'ambiente. L'ossigeno costituisce un importante parametro ambientale all'interno dell'organismo e può variare in situazioni fisiologiche o patologiche. La nostra ipotesi sperimentale è che i fibroblasti all'interno di un organismo siano normalmente esposti a basse tensioni di ossigeno e che una tensione di ossigeno del 20% rappresenti una condizione di iperossia. Variazioni nella tensione di ossigeno percepita dalle cellule provocheranno risposte cellulari differenti.

# **1. PROLIFERAZIONE E MIGRAZIONE INDOTTE DA PDGF:**

## **IL RUOLO CHIAVE DELL'ENDOCITOSI**

### **SCOPO DEL LAVORO**

I recettori tirosino-cinasi (RTK) legano principalmente fattori di crescita e hanno perciò la funzione di regolare diversi aspetti della fisiologia cellulare, quali la proliferazione, la migrazione e la sopravvivenza.

In particolare, il PDGF, interagendo con il suo recettore sulla superficie delle cellule bersaglio, attiva e regola molteplici risposte fisiologiche coinvolte sia nello sviluppo embrionale sia nella fisiologia di vari organi dell'adulto: ad esempio è coinvolto nel reclutamento dei periciti nei vasi sanguigni e nell'aggregazione piastrinica, ha un ruolo nella corretta formazione degli alveoli polmonari e dei villi intestinali, stimola la proliferazione delle cellule progenitrici degli oligodendrociti ed è fondamentale per il processo di cicatrizzazione delle ferite. Una sua alterazione può essere causa di varie patologie, come la fibrosi o l'aterosclerosi, inoltre, come altri fattori di crescita, se mutato o non correttamente regolato, può provocare trasformazione cellulare.

L'attivazione del PDGF-R comporta la trans-fosforilazione del recettore su specifici residui di tirosina, questi creano siti di attacco per varie molecole segnale coinvolte nella segnalazione cellulare e contenenti i domini SH2 o PTB, come la PI3K, PLC- $\gamma$ , Src, Grb-2, SHP-2, GAP, molecole adattatrici come Grb2, Shc, Nck, Grb7 e Crk, o attivatori trascrizionali come STAT.

L'attivazione di queste vie di segnalazione induce diverse risposte cellulari, come la proliferazione, la sopravvivenza, la migrazione o il differenziamento.

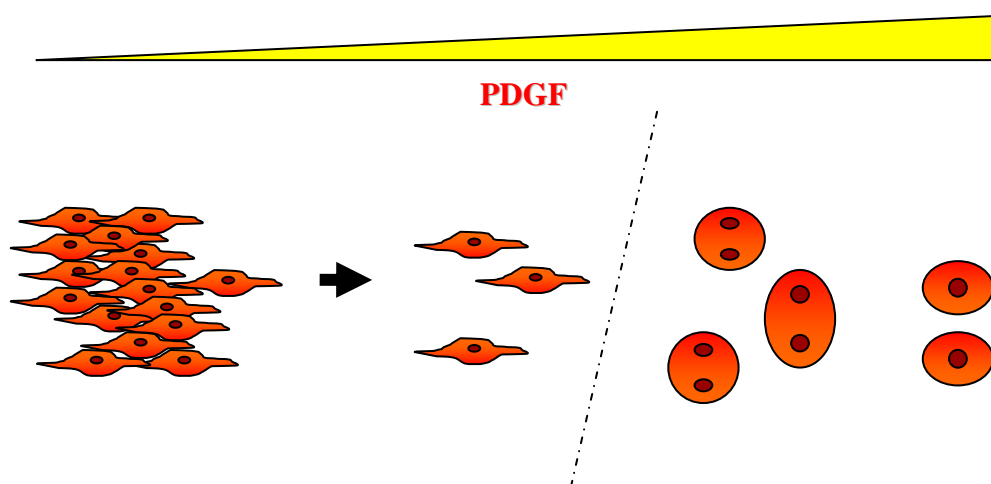
In letteratura è stato ampiamente dimostrato che il PDGF è uno dei principali regolatori delle cellule mesenchimali, ed è capace di indurre in queste cellule sia la mitosi sia la chemiotassi. Tuttavia è evidente che questi due effetti fenotipici, indotti dalla stimolazione con il PDGF, sono mutuamente esclusivi.

Nel nostro lavoro abbiamo cercato di capire come il PDGF, attivando le stesse vie di segnalazione nelle stesse cellule (NIH3T3), possa portare a risposte fenotipiche così diverse come la proliferazione e la migrazione.

La nostra ipotesi è che ogni cellula decida se migrare o proliferare in base alle concentrazioni di PDGF presenti nell'ambiente.

Ci sono varie situazioni fisiologiche in cui si può venire a creare un gradiente di un fattore di crescita, ad esempio nello sviluppo, nella riparazione delle ferite, nell'angiogenesi o anche nella crescita tumorale.

In queste condizioni, le cellule bersaglio più distanti dalla zona di rilascio del fattore di crescita percepiranno una concentrazione di PDGF più bassa e la loro risposta fenotipica sarà una migrazione direzionale lungo il gradiente; migrando lungo il gradiente, le cellule arriveranno in una zona in cui la concentrazione di PDGF supera un certo valore soglia e sarà in grado di indurle a proliferare (*fig.22*). In questo modo, ad esempio nel caso della cicatrizzazione delle ferite, le cellule prolifereranno andando a riparare il tessuto danneggiato.



*Figura 22. Schema del modello sperimentale: le cellule più lontane percepiscono una concentrazione di PDGF minore e sono indotte a migrare lungo il gradiente, quando raggiungono una zona in cui la concentrazione di ligando supera il valore soglia iniziano a proliferare.*

Questo modello è stato essenzialmente confermato dai nostri risultati sperimentali. Per spiegare come le differenti concentrazioni di PDGF siano in grado di indurre le due diverse risposte fenotipiche, abbiamo proposto un modello che coinvolge i

diversi tipi di endocitosi. Dai nostri dati sperimentali è emerso che basse concentrazioni di PDGF attivano un'endocitosi clatrina-mediata, in questo caso il recettore rimane prevalentemente sulla membrana, agendo da sensore cellulare, e non è in grado di indurre una risposta proliferativa. Invece, ad alte concentrazioni di PDGF, l'endocitosi passa, almeno in parte, ad un meccanismo di internalizzazione raft/caveole mediato: in questo modo il recettore è in grado di attivare la mitosi e infine viene degradato dal proteasoma.

## RISULTATI

### **Attivazione dose-dipendente del PDGF-R in NIH3T3**

Per i nostri esperimenti sono state utilizzate cellule NIH3T3, una linea di fibroblasti murini immortalizzati, che rappresentano un buon modello sperimentale di cellule mesenchimali e sono responsive alla stimolazione con il PDGF. Queste cellule sono state stimolate con PDGF BB, il dimero in grado di attivare tutte le isoforme dei recettori del PDGF (PDGF-R  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ ,  $\alpha\beta$ ).

Il PDGF si lega al suo recettore provocandone la dimerizzazione, l'attivazione del dominio tirosino-cinasi e la trans-fosforilazione del recettore stesso, questo porta all'attivazione delle specifiche vie di segnalazione e infine all'induzione delle diverse risposte cellulari; il recettore rimane attivo per un certo tempo, dopodiché il segnale viene spento, mediante defosforilazione del recettore ad opera di specifiche fosfatasi e, in seguito, anche tramite internalizzazione e degradazione dello stesso. L'attivazione del PDGF-R è misurabile quindi dal suo livello di fosforilazione in tirosina, e l'andamento della segnalazione cellulare può essere valutato misurando la variazione della fosforilazione del recettore nel tempo.

Come prima cosa abbiamo quindi analizzato l'attivazione del recettore in funzione del tempo, in condizioni di stimolazione con dosi diverse di PDGF.

Le cellule NIH3T3 sono state starvate 24 ore prima dell'esperimento, in modo da bloccarle in fase  $G_0$  e sincronizzarle, quindi sono state stimolate con la stessa concentrazione di PDGF per tempi diversi, la reazione è stata bloccata con PBS freddo e infine le cellule sono state poi lisate in Sample Buffer. L'esperimento è stato ripetuto con tre diverse dosi di stimolazione: 1, 5 e 30 ng/ml di PDGF BB.

I campioni così ottenuti sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e Western Blot, e incubati con anticorpi anti-fosfotirosina, in modo da valutare il livello di fosforilazione del recettore in funzione del tempo e della dose di stimolazione.

Per valutare il livello di fosforilazione netto del recettore, è stato fatto anche un riconoscimento degli stessi Western Blot con anticorpi anti-PDGF-R. In questo modo è possibile normalizzare l'intensità di fosforilazione del PDGF-R con la sua quantità totale (*fig.23*).

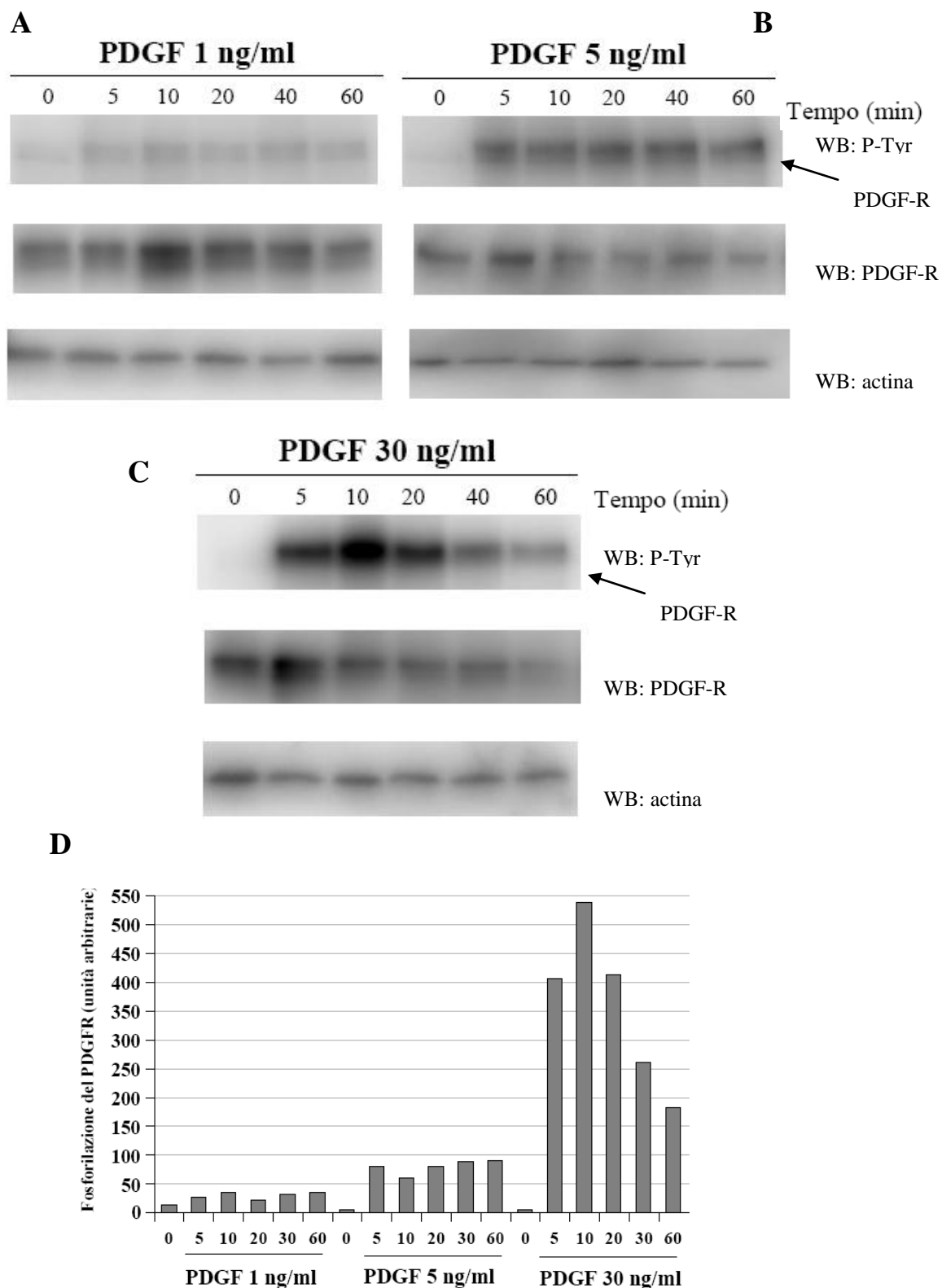


Figura 23. Tempo e dose-dipendenza nella fosforilazione del PDGFR: cellule NIH3T3 sono state starvate 24 ore, poi stimulate con 1, 5 e 30 ng/ml di PDGF per i tempi indicati e lisate in Sample Buffer. I lisati sono stati analizzati mediante Western Blot e riconosciuti con anticorpi anti-P-Tyr, anti-PDGFR e anti-actina. L'istogramma in D mostra l'analisi densitometrica della fosforilazione del PDGFR normalizzata rispetto all'actina. I dati sono rappresentativi di 5 esperimenti indipendenti.

In cellule stimulate con 30 ng/ml di PDGF BB, la fosforilazione tirosinica del PDGF-R aumenta con il tempo di stimolazione, rispetto al livello basale del controllo non stimolato, raggiunge un massimo dopo 10 minuti, dopodiché diminuisce rapidamente. Anche la quantità di recettore totale diminuisce all'aumentare del tempo di stimolazione, perché probabilmente entrano in gioco meccanismi di *down-regolazione* e degradazione del recettore (*fig.23a,d*).

Nelle stimolazioni con 1 e 5 ng/ml, la fosforilazione risulta meno intensa, come ci aspettavamo, ma il segnale di fosforilazione sembra durare più a lungo. Questo è probabilmente dovuto ad una minor degradazione del recettore in condizioni di stimolazioni con basse dosi di PDGF (*fig.23b,c,d*).

Abbiamo verificato anche che la dose di 30 ng/ml comporta una totale attivazione del recettore, infatti concentrazioni maggiori di 30 ng/ml non causano aumenti significativi dell'intensità di fosforilazione del PDGF-R.

### **Proliferazione cellulare indotta da PDGF**

La stimolazione con PDGF induce varie risposte cellulari, tra cui una delle principali è la proliferazione cellulare. Per valutare come l'attivazione dose-dipendente del recettore influenzasse questa risposta cellulare per prima cosa abbiamo effettuato delle curve di crescita, stimolando le cellule NIH3T3 con concentrazioni diverse di PDGF. Le cellule sono state starvate 24 ore prima della stimolazione con tre concentrazioni di PDGF (1; 5; 30 ng/ml); dopo 24 o 48 ore dalla stimolazione le cellule sono state trattate con una soluzione contenente il colorante vitale Crystal Violetto e trattate come detto precedentemente (vedi sezione Materiali e Metodi).

Dal grafico si nota che la dose che stimola maggiormente la crescita cellulare è quella di 30 ng/ml, come ci si poteva aspettare dall'andamento della fosforilazione in tirosina del recettore. La dose di 1 ng/ml stimola debolmente la crescita, mentre la dose di 5ng/ml la stimola fortemente, più di quanto ci saremmo aspettati dai dati sulla fosforilazione (*fig.24*).

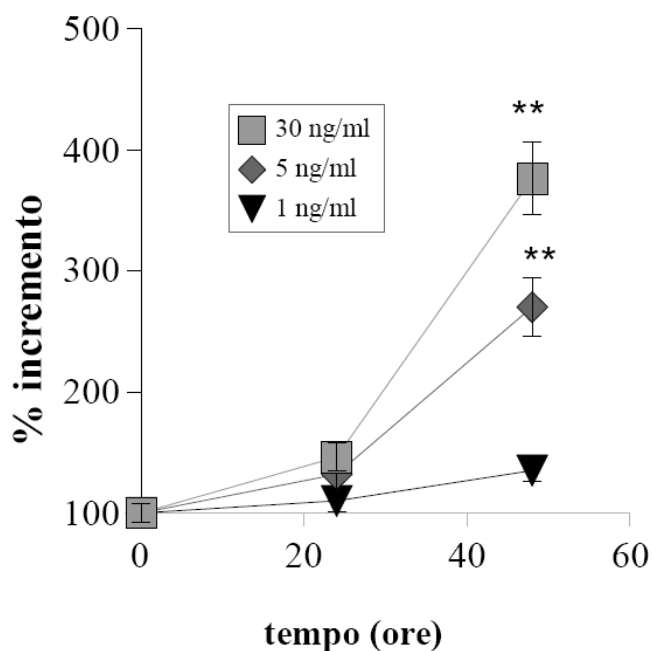


Figura 24. Proliferazione indotta da PDGF: le cellule sono state starvate 24 ore, quindi stimulate con le dosi indicate di PDGF, dopo 24 o 48 ore le cellule sono state colorate con cristal violetto, lavate con PBS e trattate con una soluzione isotonica di citrato per 1 ora a 4°C. La proliferazione è stata valutata misurando l'assorbanza a 595 nm della soluzione di citrato. N=5 in triplicato, \*\* P < 0,001 rispetto a 1 ng/ml di PDGF.

Per valutare la proliferazione cellulare è stata condotta anche un'analisi in citofluorimetria a flusso, con l'intento di determinare quale percentuale di cellule entrasse in fase S dopo un tempo predefinito di stimolazione.

Le cellule NIH3T3 sono state starvate 24 ore prima di essere stimulate a varie dosi e lasciate crescere 19 ore, tempo necessario per passare dalla fase G<sub>1</sub> alla fase S. Le cellule sono state lisate in una soluzione ipotonica contenente ioduro di propidio; questa soluzione lisa le membrane e lo ioduro di propidio si intercala al DNA, rendendo così possibile un'analisi quantitativa citofluorimetrica del contenuto cellulare di DNA. I campioni sono stati analizzati al citofluorimetro a flusso e i dati ottenuti ci hanno permesso di valutare per ogni dose di stimolazione la percentuale delle cellule in G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>, S o G<sub>2</sub>/M (fig.25).

<b>PDGF-BB</b> (ng/ml)	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>30</b>
<b>%G<sub>1</sub>/ G<sub>0</sub></b>	94,1	96,1	94,9	93,8	43,7	33,4	22
<b>% S</b>	5,4	3	4,4	5,2	<b>36,8</b>	<b>43,3</b>	<b>52,8</b>
<b>% G<sub>2</sub>/M</b>	0,5	0,9	0,7	1	19,5	23,3	26,2

Figura 25. Analisi citofluorimetrica: sono state piastrate  $5 \times 10^5$  cellule, starvate 24 ore, quindi stimolate alle dosi indicate di PDGF e lasciate crescere per 19 ore. Le cellule sono state lisate in 0,6 ml della soluzione ipotonica contenente ioduro di propidio e analizzate con un citofluorimetro a flusso Becton-Dickinson FACscan con laser ad argon a 488 nm e filtro in emissione a  $\sim 600$  nm. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

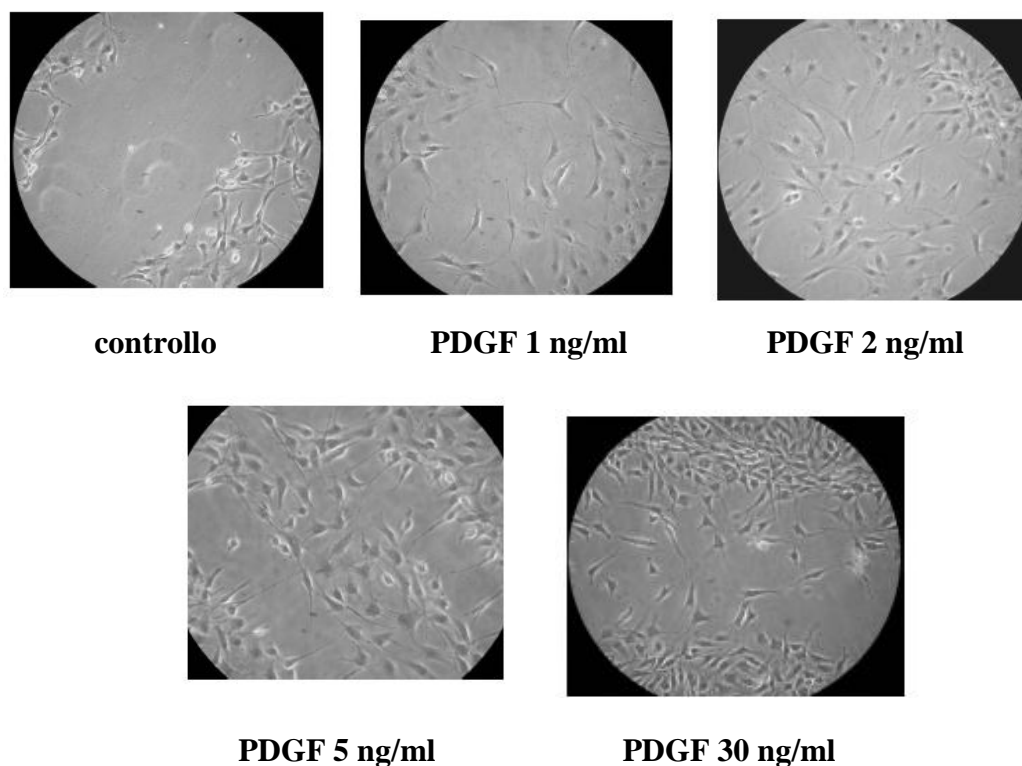
La percentuale di cellule in fase S dopo 19 ore dalla stimolazione aumenta al crescere della dose di stimolazione. Anche in questo caso, l'andamento segue solo in parte ciò che avremmo potuto prevedere in base alla fosforilazione del PDGF-R, infatti c'è un effetto proliferativo molto marcato a 30 ng/ml di stimolazione, ma anche a concentrazioni di 5 e 10 ng/ml, per le quali la fosforilazione sembrava piuttosto bassa, si ha un aumento netto di cellule in fase S rispetto alle concentrazioni più basse. Per concentrazioni inferiori a 2 ng/ml, invece, l'effetto proliferativo è nullo, infatti la percentuale di cellule in fase S è praticamente uguale a quella del controllo.

### **Migrazione indotta da PDGF**

L'altra principale risposta indotta dalla segnalazione del PDGF è la migrazione cellulare. Anche in questo caso abbiamo analizzato come l'attivazione dose-dipendente del recettore influenzasse questa risposta cellulare.

Per valutare l'effetto fenotipico della migrazione per prima cosa abbiamo eseguito dei test di *wound healing* a varie concentrazioni di stimolazione con PDGF. Le cellule sono state lasciate crescere fino a confluenza, quindi starvate per 24 ore. Dopodiché è stata rimossa meccanicamente, con l'uso di una punta sterile, una striscia di cellule nella zona centrale della piastra e le cellule sono state stimolate con dosi crescenti di PDGF. A distanza di 17 ore abbiamo osservato le piastre al

microscopio, per valutare la presenza o meno di cellule nella striscia centrale, indice di migrazione cellulare (*fig.26*).



*Figura 26. Test di wound healing su cellule NIH3T: le cellule sono state fatte crescere a confluenza, poi starvate per 24 ore, è stata rimossa una striscia uniforme di cellule dalla zona centrale con una punta sterile, quindi le cellule sono state stimulate con concentrazioni crescenti di PDGF. Dopo 17 ore sono state osservate al microscopio le cellule migrate nella zona centrale. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.*

Dalle immagini ottenute al microscopio risulta evidente come la risposta migratoria non segua lo stesso andamento dell'attivazione del recettore. La risposta più evidente di migrazione infatti è riscontrabile per dosi alle quali il recettore è poco fosforilato. Per stimolazioni con basse concentrazioni di PDGF, come 1 o 2 ng/ml, che non sono in grado di attivare la risposta proliferativa, la migrazione è molto intensa. A concentrazioni maggiori, come 5 e 30 ng/ml di PDGF, alle quali si ha invece la piena attivazione del recettore e l'induzione alla proliferazione, la migrazione è minore e le cellule presenti nella striscia centrale probabilmente sono dovute ad un effetto combinato di migrazione e proliferazione (*fig.26*).

Dosi di 2 e 5 ng/ml sembrano essere quindi quelle che meglio attivano la segnalazione che porta all'effetto chemiotattico, responsabile, ad esempio, del coinvolgimento dei fibroblasti nella riparazione delle ferite.

Per approfondire meglio l'analisi di questa risposta, abbiamo effettuato una quantificazione della migrazione in base alle concentrazioni di PDGF, effettuando test bi-dimensionale di migrazione (*fig.27*), come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

Questi esperimenti confermano che la migrazione è più intensa per stimolazioni con concentrazioni basse di PDGF. Le cellule stimolate con una concentrazione di 1 ng/ml di PDGF migrano in media di più e raggiungono distanze maggiori rispetto a quelle stimolate con concentrazioni maggiori.

Questi primi dati dimostrano che basse concentrazioni di PDGF (1-2 ng/ml) sono in grado di indurre la migrazione cellulare, ma non la proliferazione, mentre per concentrazioni maggiori (5-30 ng/ml) prevale l'effetto proliferativo.

Il PDGF quindi, all'aumentare della concentrazione, induce nelle NIH3T3 un passaggio progressivo da una risposta di migrazione a una di proliferazione.

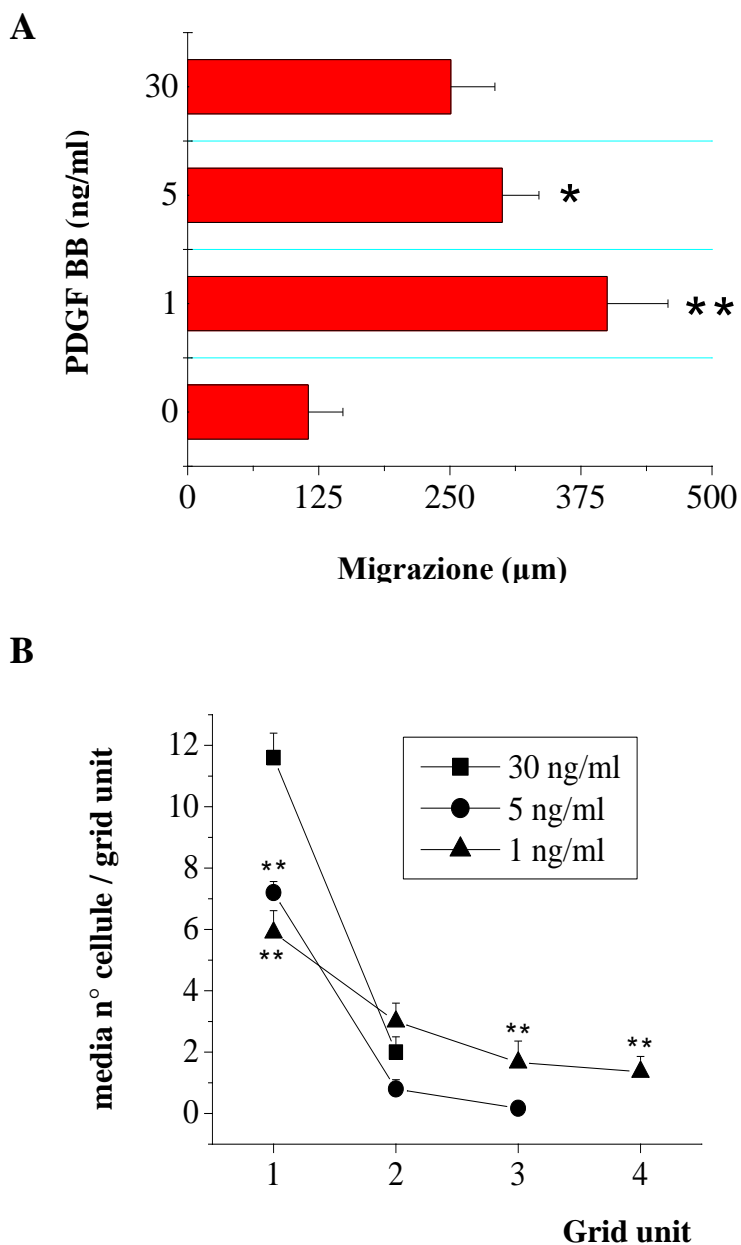


Figura 27. Migrazione indotta da PDGF: A) il diagramma riporta la distanza di migrazione media raggiunta delle cellule in funzione della dose di PDGF.  $n=6$ ,  $*P<0,05$ ,  $** P<0,001$  rispetto a 30 ng/ml. B) il grafico riporta la distanza percorsa, in  $\mu\text{m}$ , dalla linea di partenza, è stato contato il numero di cellule presenti in ogni grid unit a partire dalla linea di partenza (grid unit 0) verso l'esterno.  $n=3$  in duplicato,  $**$  rispetto a 30 ng/ml  $P<0,001$ .

### **Attivazione differenziale delle vie di segnalazione**

La fosforilazione del PDGF-R cresce linearmente all'aumentare della concentrazione di stimolazione, invece le variazioni negli effetti fenotipici sono tutt'altro che lineari, anzi, si hanno cambiamenti drastici nella risposta cellulare in funzione delle concentrazioni di PDGF.

Abbiamo studiato quindi l'attivazione delle vie di segnalazione intracellulari innescate dal PDGF, scegliendo molecole segnale caratteristiche delle diverse risposte cellulari, in modo da evidenziare l'attivazione maggiore o minore di vie di segnalazione specifiche per la proliferazione o per la migrazione.

In particolare abbiamo analizzato l'attivazione dose-dipendente di Ras e PI-3K, come prototipi delle risposte di proliferazione e sopravvivenza cellulare, e di molecole come Rho, Rac e FAK, come prototipi delle vie di segnalazione coinvolte nel rimodellamento del citoscheletro e nella migrazione cellulare.

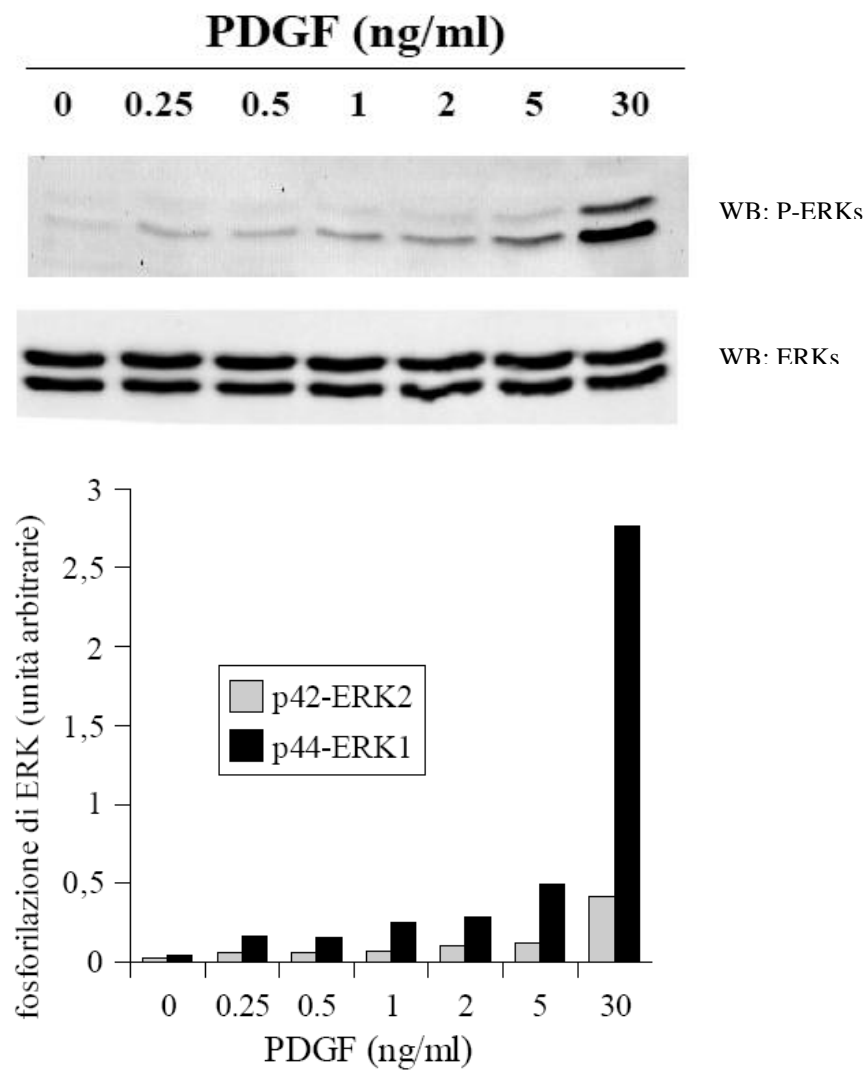
#### *Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2*

Come molecole coinvolte nella risposta proliferativa abbiamo scelto le MAPK ERK 1 e 2, due serino-treonino cinasi di 44 e 42 KDa, che rappresentano gli effettori finali della via di segnalazione innescata da Ras.

La cascata del segnale delle ERK è uno dei processi più ben conservati nell'evoluzione; sono state identificate diverse isoforme di ERK, tutte attivate secondo un meccanismo comune, indotto prevalentemente da citochine, stress e fattori di crescita. Il PDGF-R, attivo e fosforilato, interagisce con la molecola adattatrice Sos, contenente domini SH3. Sos è un fattore di scambio nucleotidico di Ras, converte la forma inattiva Ras-GDP nella attiva Ras-GTP; Ras-GTP lega la porzione N-terminale della serina-treonina cinasi Raf, attivandola; questa, a sua volta, lega e fosforila MEK (*MAP-cinasi-cinasi*). Questa è una cinasi a doppia specificità ed ha proprio la funzione di attivare le MAPK ERK1 e ERK2, fosforilandole su un residuo di tirosina e su uno di treonina separati nella sequenza da un acido glutammico. ERK 1 e 2 sono proteine ubiquitarie ed hanno un ruolo fondamentale nella stimolazione alla proliferazione, fosforilano proteine bersaglio su residui di serina o treonina all'interno di sequenze di riconoscimento PX(T/S)P, possono traslocare nel nucleo, dove attivano vari fattori di trascrizione della famiglia ETS, caratterizzati da motivi *helix-turn-helix*, responsabili dell'aumento di

espressione di proteine coinvolte nella progressione cellulare, come ad esempio la ciclina D1 (Treisman R, 1995).

Le cellule sono state starvate 24 ore, poi stimolate a dosi crescenti di PDGF BB per 5 minuti, e lisate in RIPA Buffer. I campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e Western Blot, quindi le membrane sono state trattate con anticorpi specifici per fosfo-ERK e, dopo stripping, con anticorpi specifici per ERK, per valutare la fosforilazione netta di queste cinasi (*fig.28*).



*Figura 28. Determinazione della fosforilazione delle ERK 1 e 2 indotta da PDGF: le NIH3T3 sono state starvate 24 ore, quindi stimolate alle concentrazioni indicate di PDGF per 5 minuti e lisate in RIPA Buffer. I campioni ottenuti sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-P-ERK e anti-ERK. I valori dell'istogramma rappresentano il rapporto fra i valori ottenuti con l'analisi densitometrica delle bande. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.*

Per basse concentrazioni di PDGF l'attività delle ERK cresce poco rispetto al controllo, come si può vedere dall'istogramma che riporta la quantificazione dell'intensità del segnale, invece a dosi di 30 ng/ml l'intensità è notevolmente più alta, e corrisponde alla piena attivazione di ERK 1 e 2.

L'attivazione dose-dipendente delle MAPK segue quindi lo stesso andamento della fosforilazione del recettore, infatti per entrambe le proteine si ha un'attivazione proporzionale alla concentrazione di PDGF. Questa via di segnalazione viene attivata soprattutto ad alte concentrazioni di PDGF (5 e 30 ng/ml), in accordo con il fatto che in queste condizioni si ha un'intensa attivazione della mitosi.

### Akt

Come altra via di segnalazione coinvolta nello stimolo proliferativo, abbiamo analizzato quella di PI3K/Akt.

Akt (o PKB) è una Ser/Thr cinasi, nella segnalazione del PDGF viene attivata tramite uno dei principali effettori del PDGF-R, la PI3K. L'attivazione di PI3K comporta la formazione, a livello della membrana cellulare, di PIP3, a cui Akt si lega tramite i suoi domini PH, viene quindi fosforilata e attivata da PDK1. Una volta attivata, Akt fosforila diversi substrati, tra cui Bad e il fattore di trascrizione Fkhr1, sopprimendo il loro effetto pro-apoptotico.

I campioni, ottenuti come descritto precedentemente, sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e Western Blot, e le membrane trattate con anticorpi anti-fosfo-Akt e, dopo stripping, con anticorpi anti-Akt (*fig.29*).

L'attivazione dose-dipendente della cinasi Akt non è esattamente sovrapponibile a quella del PDGF-R, infatti la fosforilazione di Akt aumenta già a concentrazioni di PDGF di 1-2 ng/ml, alle quali non si ha stimolo proliferativo e il livello più alto di fosforilazione si ha non a 30 ng/ml, bensì a 5 ng/ml.

Una spiegazione plausibile è che l'attivazione di Akt non è coinvolta solo nella proliferazione, ma anche nell'inibizione dell'apoptosi, quindi può essere attiva anche in condizioni non proliferative, come, ad esempio, a basse concentrazioni di PDGF.

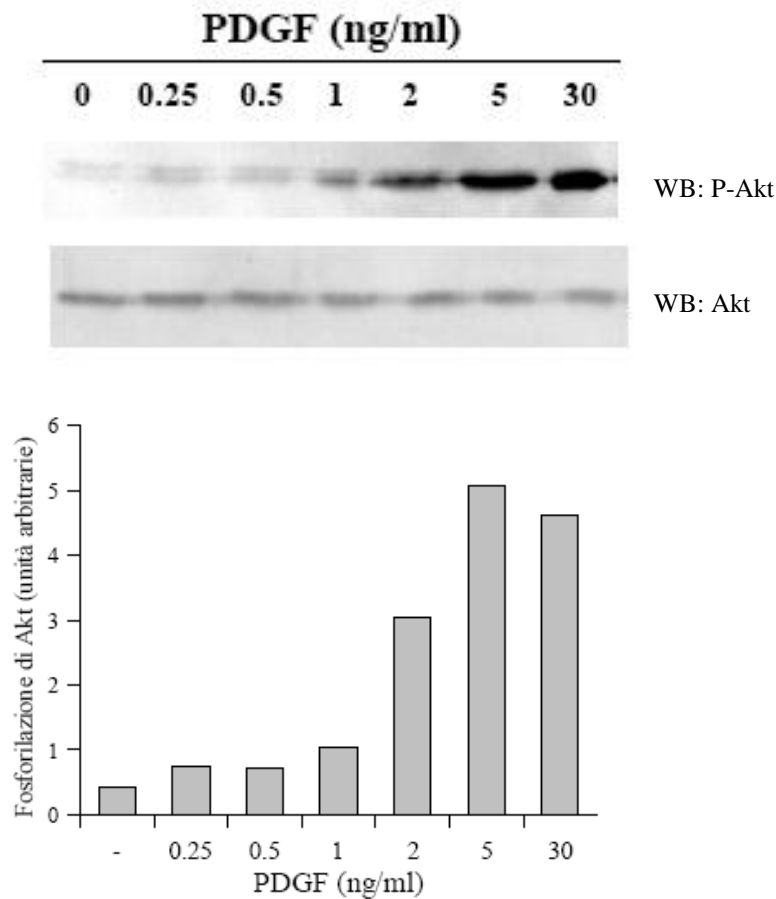
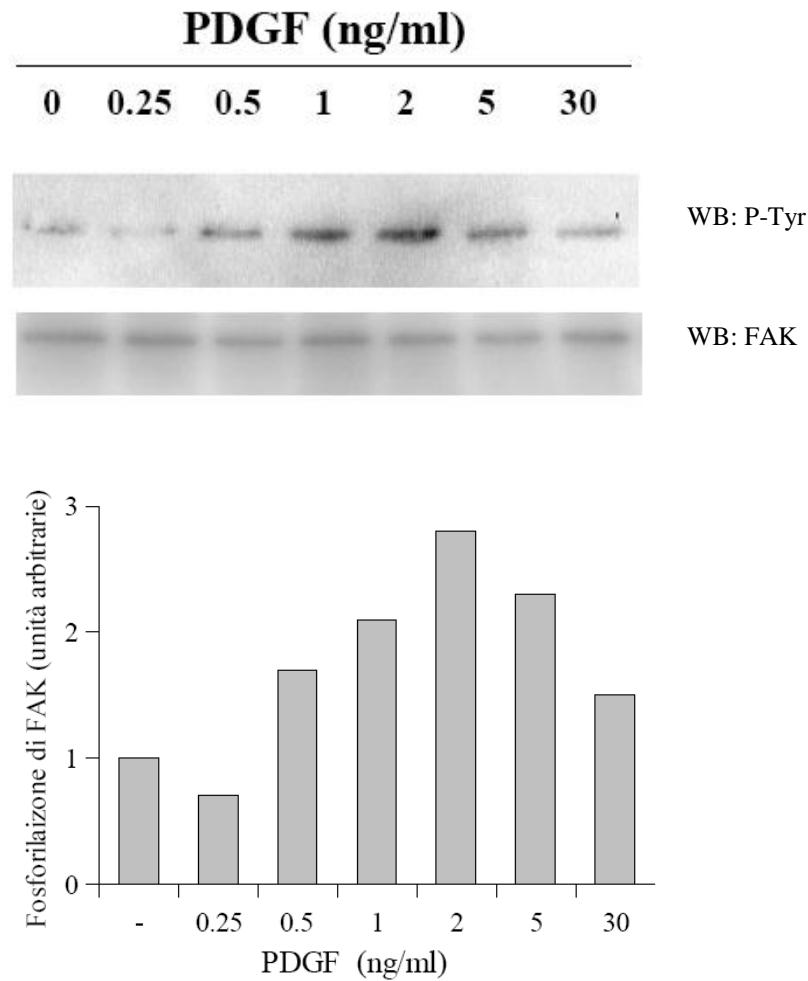


Figura 29. Determinazione della fosforilazione di Akt indotta da PDGF: le NIH3T3 sono state stimulate alle concentrazioni indicate di PDGF per 5 minuti e i campioni ottenuti analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-P-Akt e anti-Akt. I valori dell'istogramma rappresentano il rapporto fra i valori ottenuti con l'analisi densitometrica delle bande. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

### Focal adhesion kinase (FAK)

FAK è una cinasi coinvolta nella formazione delle placche di adesione, in seguito a stimolazione con PDGF viene attivata la cinasi di membrana Src che fosforila FAK, questa diminuisce l'adesività cellulare, favorendo la migrazione.

Per valutare il livello di fosforilazione di FAK, abbiamo stimolato le cellule con concentrazioni crescenti di PDGF per 5 minuti, poi lisate in RIPA Buffer ed è stata eseguita un'immunoprecipitazione con anticorpi anti-FAK. Gli immunoprecipitati sono stati quindi lisati in Sample Buffer, analizzati mediante SDS-PAGE e Western Blot utilizzando anticorpi anti-fosfo-tirosina e anti-FAK (fig.30).



*Figura 30. Determinazione della fosforilazione di FAK indotta da PDGF: le NIH3T3 sono state stimolate alle concentrazioni indicate di PDGF per 5 minuti. FAK è stata immunoprecipitata dai lisati ed è stato fatto un Western Blot con anticorpi anti-Tyr, dopo stripping le membrane sono state trattate con anticorpi anti-FAK per normalizzare i risultati ottenuti. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.*

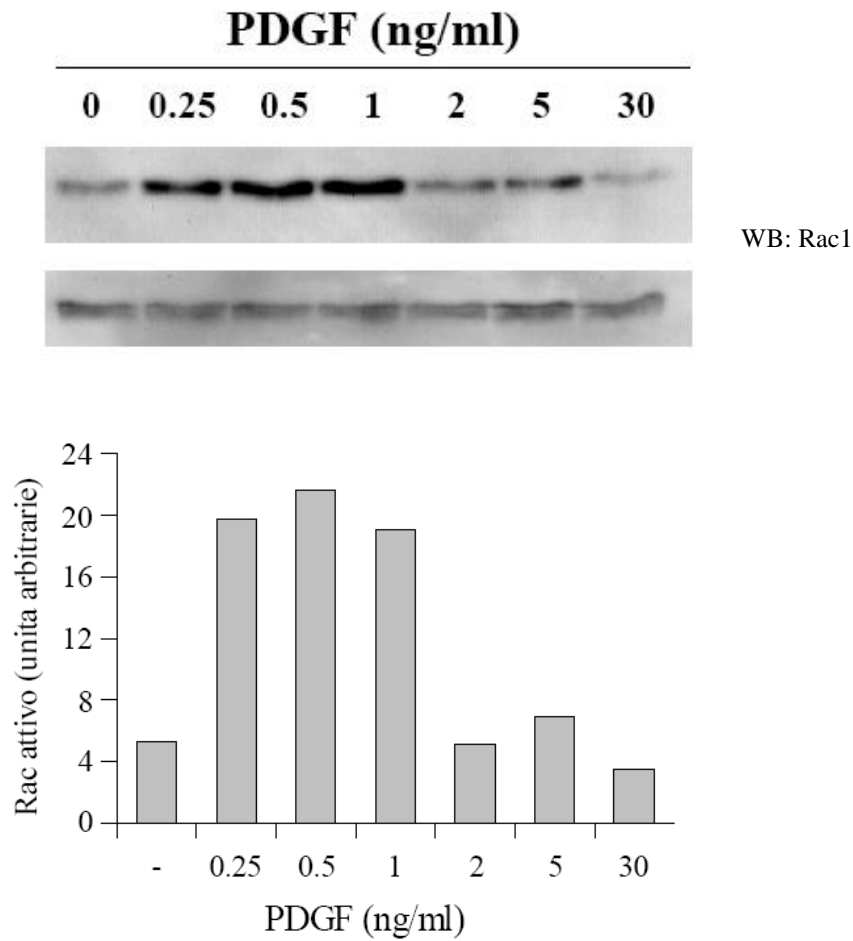
L'attivazione dose-dipendente di FAK è notevolmente diversa dalla fosforilazione del PDGF-R, in questo caso infatti si ha un massimo di attivazione per stimolazioni di 1-2 ng/ml di PDGF, dose per la quale la fosforilazione del recettore è molto bassa. Per concentrazioni maggiori di PDGF il livello di fosforilazione di FAK diminuisce nettamente e a 30 ng/ml l'intensità del segnale è molto più bassa di quella della stimolazione a 1 ng/ml. Questo concorda con l'attivazione della migrazione a basse concentrazioni di PDGF.

### Rac e Rho

Rac e Rho appartengono alla famiglia delle piccole GTPasi di Rho, giocano un ruolo chiave nei meccanismi di riorganizzazione del citoscheletro e dell'actina coinvolti nell'attivazione di una migrazione direzionale. Una volta attivate, queste proteine G monomeriche sono capaci di reclutare effettori intracellulari che inducono risposte cellulari quali la protrusione di filipodi (Rac) o lamellipodi (Cdc42) dalla membrana, o eventi coinvolti nella contrattilità mediata dalla miosina (Rho), che favoriscono la retrazione della membrana.

Nella segnalazione del PDGF-R, la PI3K attiva la proteina G Rac, che passa quindi dalla forma inattiva che lega GDP alla forma attiva che lega GTP. L'attivazione di Rac viene misurata con un *pull down assay*, utilizzando la proteina di fusione PAK-CRIB-GST: PAK è una proteina che ha la capacità di legare solo la forma attiva di Rac, mentre la GST serve a legare la proteina al glutatione della resina. Le cellule sono state stimolate con dosi crescenti di PDGF, lisate in RIPA Buffer e trattate come indicato (vedi sezione Materiali e Metodi), è stata aggiunta la resina con la proteina di fusione GST-CRIB-PAK, i campioni sono stati poi lisati in Sample Buffer e analizzati mediante SDS-PAGE e Western Blot utilizzando anticorpi anti-Rac1, per dosare la quantità di Rac attiva. Parallelamente parte delle cellule sono state lisate direttamente in RIPA Buffer e analizzate mediante Western Blot con anticorpi anti-Rac1 per normalizzare l'attivazione di Rac sulla quantità totale di proteina (*fig. 31*).

Anche per misurare l'attivazione di Rho è stato fatto un *pull down assay*, utilizzando in questo caso la molecola Rhotekin RDB. Le NIH3T3 sono state stimolate per 5 minuti alle concentrazioni indicate, poi lisate in RIPA Buffer, i lisati sono stati incubati con la resina agarosio legata alla Rhotekin RDB, che lega la proteina Rho attiva. Anche in questo caso parte delle cellule sono state lisate direttamente in RIPA Buffer e analizzate mediante Western Blot con anticorpi anti-Rho, per normalizzare il risultato sulla quantità totale di Rho (*fig.32*).



*Figura 31. Determinazione dell'attivazione di Rac indotta da PDGF: le NIH3T3 sono state stimulate alle concentrazioni indicate di PDGF per 5 minuti, poi lisate in RIPA Buffer ed è stato fatto un pull down assay utilizzando la proteina GST-CRIB-PAK. I campioni lisati in Sample Buffer sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-Rac1, la normalizzazione è stata fatta misurando la quantità di Rac su lisati totali. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.*

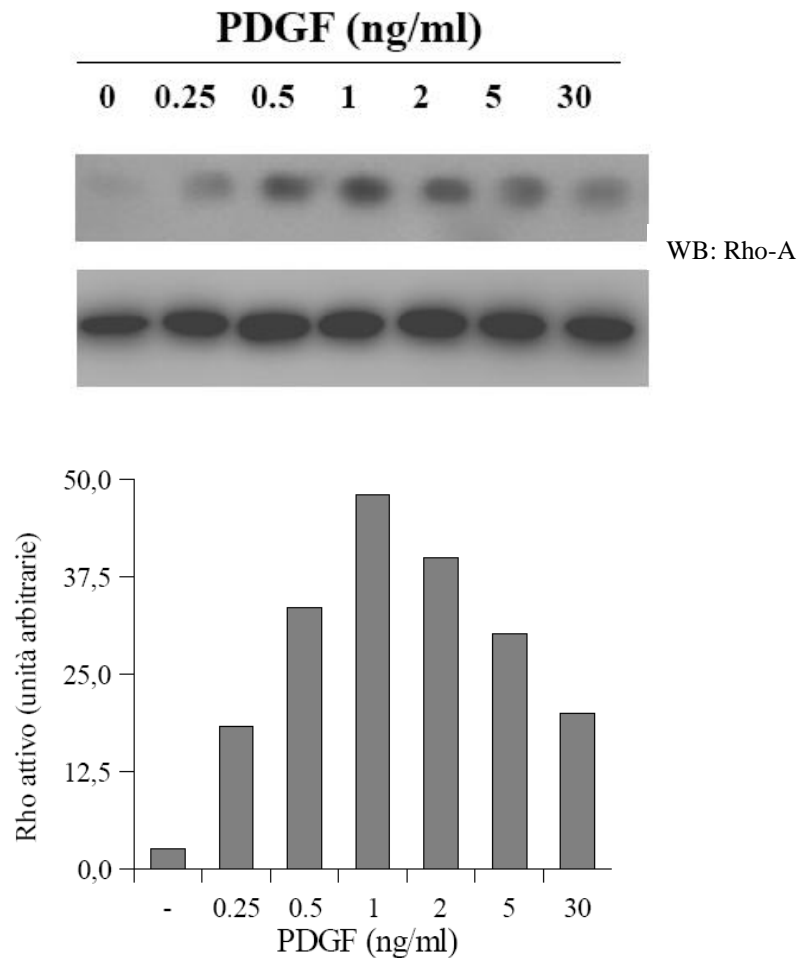


Figura 32. Determinazione dell'attivazione di Rho indotta da PDGF: le NIH3T3 sono state stimulate alle concentrazioni indicate di PDGF per 5 minuti, poi lisate in RIPA Buffer ed è stato fatto un pull down assay utilizzando la proteina Rhotekin RDB. I campioni lisati in Sample Buffer sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-RhoA, la normalizzazione è stata fatta misurando la quantità di Rho su lisati totali.

Anche in questo caso, l'attivazione dose-dipendente delle G proteine, mostra un andamento molto diverso da quello della fosforilazione del recettore del PDGF: Rac ha un massimo di attivazione a concentrazioni di 0,25-1 ng/ml di PDGF, Rho a 1-2 ng/ml. Anche questi risultati confermano che solo le basse concentrazioni di PDGF sono in grado di stimolare la migrazione cellulare.

I dati molecolari sull'attivazione di FAK, Rac1 e Rho confermano gli effetti fenotipici del test di *wound healing*: la migrazione è attiva soprattutto a basse dosi, con un picco intorno a 1 ng/ml e, con il crescere della dose, diminuisce d'intensità.

Per confermare il ruolo dell'attivazione di Rac e Rho nella migrazione cellulare indotta a basse dosi di PDGF, abbiamo ripetuto i test di migrazione in presenza di inibitori specifici per queste proteine. Le cellule NIH3T3 sono state fatte crescere fino a confluenza e trattate come descritto precedentemente per il test di *wound healing*, poi sono state stimulate con una concentrazione di 2 ng/ml di PDGF e contemporaneamente trattate con l'inibitori di Rac1 (NSC23766) ad una concentrazione di 50  $\mu$ M, o con l'inibitore della cinasi di Rho, la *G-protein Rho-associated kinase* o ROCK (Y-27632), ad una concentrazione di 10  $\mu$ M (fig.33).

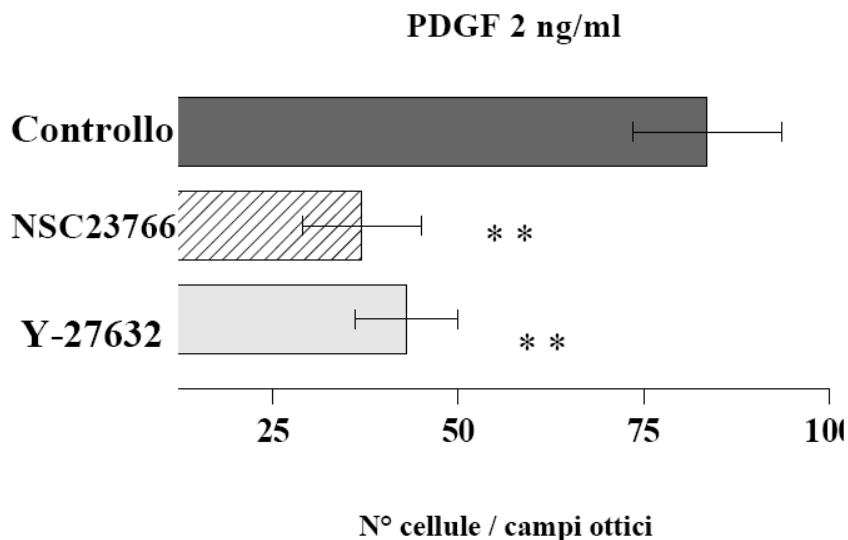


Figura 33. Test di *wound healing* in presenza degli inibitori di Rac e di ROCK: le cellule sono state stimulate con una concentrazione di 2 ng/ml di PDGF e trattate con gli inibitori. Dopo 17 ore sono state contate le cellule presenti nella striscia centrale, le medie sono state calcolate su 15 campi ottici diversi. I risultati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti. \*\*  $P < 0,001$  rispetto a PDGF 2 ng/ml.

Entrambi questi inibitori sono in grado di ridurre la migrazione indotta da PDGF.

In conclusione, quindi, le basse concentrazioni di PDGF (< 5 ng/ml) attivano le vie di segnalazione di Rho, Rac e FAK, che comportano un riarrangiamento del citoscheletro e inducono la migrazione cellulare. A queste stesse dosi, invece, le vie di segnalazione responsabili dell'induzione alla proliferazione, come Ras/ERKs e PI-3K/Akt, non sono attive.

Invece, ad alte concentrazioni di PDGF (> 5 ng/ml) le vie di Rho, Rac e FAK non sono attive, mentre le vie coinvolte nella progressione del ciclo cellulare sono fortemente stimulate.

### **Reversibilità della migrazione e irreversibilità della mitosi.**

Abbiamo dimostrato quindi che la risposta cellulare indotta dalla stimolazione con PDGF dipende dalla concentrazione di ligando presente.

A basse concentrazioni di PDGF le NIH3T3 sono stimulate a migrare, mentre ad alte concentrazioni di ligando la risposta fenotipica indotta è la proliferazione cellulare, anche l'attivazione delle vie di segnalazione alle diverse concentrazioni ha confermato questa risposta differenziale. Ciò significa che anche a basse dosi, alle quali non è evidenziabile un netto aumento di fosforilazione del recettore, questo è comunque già attivo e in grado di segnalare, attivando molecole che stimolano la migrazione e la sopravvivenza cellulare; invece, ad alte dosi, per le quali il recettore è intensamente fosforilato, viene attivato il programma che conduce alla proliferazione cellulare e la migrazione viene inibita.

Secondo il nostro modello, la migrazione cellulare indotta da PDGF rappresenta un programma reversibile: ogni singola cellula migra nella direzione del gradiente del ligando, man mano che si avvicina all'origine del gradiente la concentrazione del ligando aumenta, finché non raggiunge una zona in cui la concentrazione di PDGF supera la soglia necessaria ad innescare la divisione cellulare. La mitosi rappresenta invece un programma irreversibile e il processo di duplicazione viene portato a termine senza essere ulteriormente influenzato dai segnali extracellulari.

Cellule NIH3T3 sono state starvate 24 ore e poi stimulate con tre diverse concentrazioni di PDGF: 1, 2 e 30 ng/ml. Una serie è stata lisata dopo 5 minuti di stimolazione, le altre sono state lasciate per 8 ore, dopodiché alcune sono state lisate, altre sono state nuovamente stimulate con 30 ng/ml di PDGF per 5 minuti. I campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e Western Blot, utilizzando anticorpi anti-fosfo-tirosina e anticorpi anti-PDGF-R (*fig. 34*).

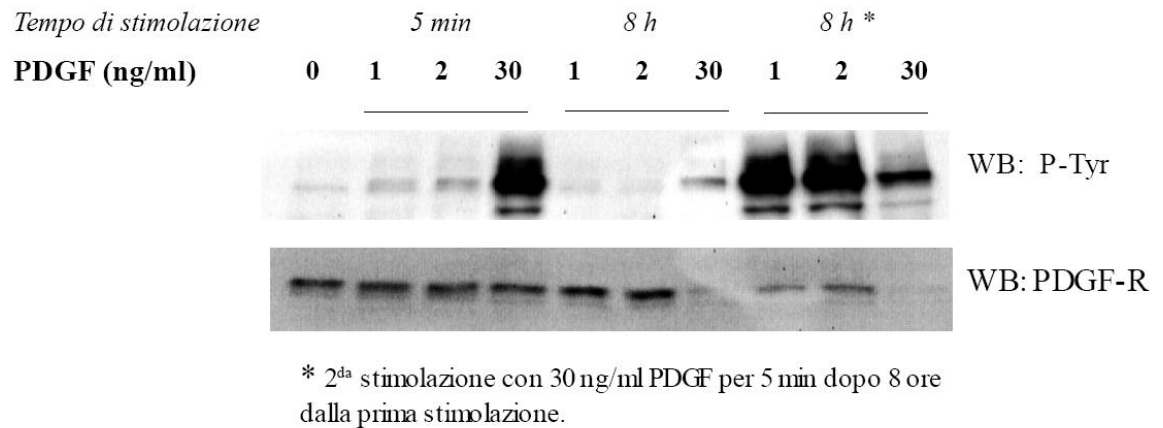


Figura 34. Cellule NIH3T3 sono state starvate 24 ore e poi stimolate alle diverse concentrazioni di PDGF per i tempi indicati. I lisati sono stati quindi analizzati mediante Western Blot e riconosciuti con anticorpi anti-P-Tyr e anti-PDGF-R.. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Dopo 5 minuti di stimolazione, le concentrazioni di 1 e 2 ng/ml causano solo una debole fosforilazione del recettore, responsabile dell'induzione della migrazione, mentre la concentrazione di 30 ng/ml comporta un'evidente fosforilazione del recettore, che è correlata allo stimolo proliferativo. Dopo 8 ore di stimolazione la fosforilazione del recettore è praticamente azzerata per le basse dosi, mentre è ancora parzialmente presente per la dose di 30 ng/ml.

Trascorse le 8 ore di stimolazione, le cellule stimolate con basse concentrazioni di PDGF mostrano livelli elevati di PDGF-R, invece, in quelle stimolate con alte concentrazioni di PDGF, si ha una forte riduzione nell'espressione del recettore. A causa di questo, la seconda stimolazione con 30 ng/ml di PDGF, dopo 8 ore dalla prima, comporta un aumento di fosforilazione solo nelle cellule che erano state precedentemente stimolate con concentrazioni basse.

Ciò significa che, probabilmente, stimolando con basse concentrazioni di PDGF, il recettore rimane prevalentemente sulla membrana e agisce da sensore nel direzionare la migrazione cellulare, mentre con alte concentrazioni di PDGF questo viene internalizzato e degradato, rendendo la cellula meno responsiva a nuove stimolazioni.

Per dimostrare che la mitosi indotta ad alte concentrazioni di PDGF rappresenta invece un programma irreversibile è stata condotta un'analisi del ciclo cellulare: le cellule NIH3T3 sono state starvate 24 ore e stimolate tutte con 30 ng/ml di PDGF per un tempo variabile, quindi sono state lavate con PBS e messe nuovamente in terreno di starvazione. Trascorse 20 ore dalla stimolazione, indipendentemente dal tempo di

incubazione prima del lavaggio, le cellule sono state lisate con la soluzione ipotonica contenente ioduro di propidio e i campioni analizzati al citofluorimetro (*fig.35*).

<b>Tempo</b>	<b>0</b>	<b>10'</b>	<b>20'</b>	<b>30'</b>	<b>1 h</b>	<b>2h</b>	<b>20 h</b>
<b>G1</b>	93.0	60.35	58.26	58.11	56.13	55.91	53.17
<b>S</b>	5.09	29.76	31.17	29.65	33.17	29.67	34.18
<b>G2 / M</b>	1.98	9.88	10.57	12.24	10.69	14.42	12.65

*Figura 35. Le NIH3T3 sono state starvate per 24 ore prima di essere stimolate con 30 ng/ml di PDGF per il tempo indicato, dopodiché sono state lavate con PBS e rimesse in terreno di starvazione. Trascorse 20 ore sono state lisate con 0,6 ml di soluzione con ioduro di propidio e analizzate al citofluorimetro.*

I risultati dimostrano che la percentuale di cellule che entra in fase S dopo 20 ore è la medesima, indipendentemente dal tempo di incubazione con il ligando.

La presenza di PDGF nell'ambiente esterno è necessaria per soli 10 minuti, o forse anche meno, e questa è sufficiente ad innescare irreversibilmente il processo della mitosi, nella stessa misura di quanto succede se il ligando viene mantenuto nel mezzo esterno per 20 ore.

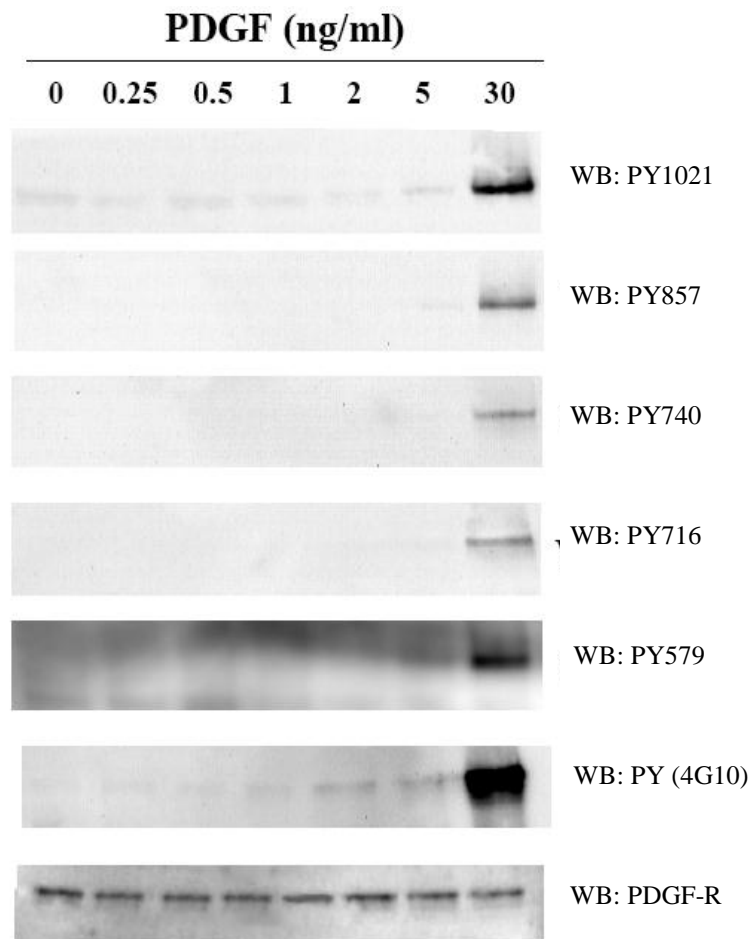
### **Fosforilazione sito-specifica del PDGF-R**

I risultati ottenuti ci fanno capire che deve esserci un meccanismo secondo il quale una cellula è in grado di decidere se migrare o proliferare in base alla concentrazione di PDGF presente.

Possiamo avanzare diverse ipotesi sul modo in cui la cellula possa far prevalere una risposta piuttosto che un'altra: un'ipotesi "qualitativa", cioè che il PDGF-R possa rispondere in modo diverso alla stimolazione in base alla concentrazione del ligando, oppure un'ipotesi "quantitativa". Secondo la prima ipotesi, le basse concentrazioni di PDGF potrebbero causare la fosforilazione di residui di Tyr diversi rispetto a quelli fosforilati ad alte concentrazioni di PDGF, questa differenza "qualitativa" nella fosforilazione del recettore spiegherebbe l'attivazione delle diverse vie di segnalazione e quindi le diverse risposte fenotipiche. Nella seconda ipotesi, invece, la fosforilazione del recettore è la stessa, indipendentemente dalla concentrazione di PDGF, e il diverso comportamento cellulare è dovuto al numero di recettori attivati.

Per verificare l'ipotesi "qualitativa" abbiamo analizzato l'attivazione dose-dipendente di cinque differenti tirosine del PDGF-R, responsabili dell'attivazione di importanti molecole segnale, come PI-3K (Tyr<sup>740</sup>), Src (Tyr<sup>579</sup>), Grb2 (Tyr<sup>716</sup>), PLC-g1 (Tyr<sup>1021</sup>) e la Tyr<sup>857</sup> che è coinvolta nell'attivazione del dominio cinasico.

Le cellule sono state stimulate con concentrazioni crescenti di PDGF per 5 minuti, poi lisate e analizzate mediante Western Blot con anticorpi specifici per le diverse tirosine del recettore (*fig.36*).



*Figura 36. Fosforilazione sito-specifica del PDGF-R: le cellule sono state starvate 24 ore e poi stimulate alle concentrazioni indicate per 5 minuti. Le cellule sono state lisate direttamente in Sample Buffer e i campioni analizzati mediante Western Blot con vari anticorpi anti-fosfotirosina specifici, con anti-fosfotirosina generici (4G10) e con anti-PDGF-R. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.*

I risultati dimostrano che non ci sono differenze significative nella fosforilazione di queste tirosine in base alla concentrazione di PDGF, seguono tutte, invece, lo stesso

andamento della fosforilazione totale del recettore, ovvero, c'è un aumento della fosforilazione con il crescere della dose, e una massima attivazione a 30 ng/ml. Questo prova quindi che l'attivazione differenziale della segnalazione del PDGFR non è dovuta ad una diversa fosforilazione delle tirosine.

### **Internalizzazione dose-dipendente del PDGF-R**

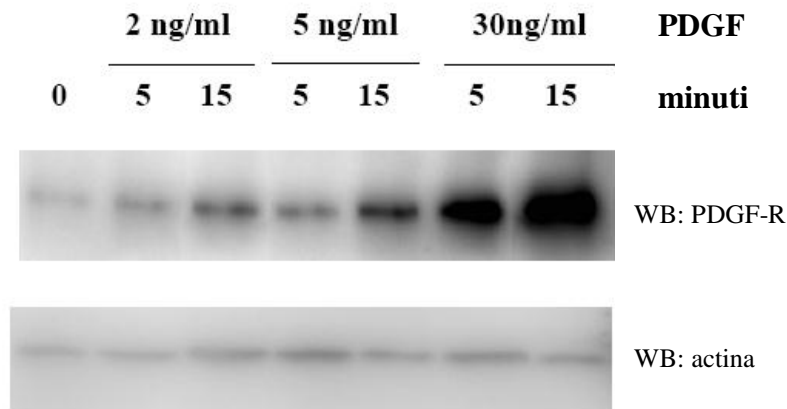
Secondo l'ipotesi "quantitativa", invece, il comportamento del PDGF-R e l'attivazione differenziale delle vie di segnalazione sarebbero causati dal diverso numero di recettori attivati. Il numero di recettori presenti sulla membrana, e quindi attivabili dal ligando, è influenzato dal tasso di internalizzazione e di degradazione, che rappresentano una delle principali conseguenze dell'attivazione del recettore, soprattutto ad alte concentrazioni di stimolazione.

Sembra inoltre che l'internalizzazione non abbia solo un ruolo nella degradazione, ma che sia anche coinvolta nell'attivazione di alcune vie di segnalazione. È stato dimostrato che gli RTK possono segnalare anche all'interno degli endosomi: ad esempio l'EGF-R, anche quando viene internalizzato risulta essere attivo, iperfosforilato e associato a varie molecole segnale (Wang Z et al., 1996; Di Guglielmo GM et al., 1994). Per il PDGF-R è stato visto che il recettore  $\beta$ , complessato con il ligando, resta attivo e fosforilato all'interno dell'endosoma (Sorkin A et al., 1993), questa internalizzazione potrebbe rappresentare un meccanismo coinvolto nell'attivazione delle MAPK (Chiarugi P et al., 2002; Rakhit S, 2000).

Abbiamo quindi ipotizzato che diverse concentrazioni di PDGF inducano una diversa localizzazione del PDGF-R e che questa sia responsabile della segnalazione specifica che induce la cellula a migrare piuttosto che a proliferare.

L'internalizzazione del recettore è stata misurata secondo il protocollo descritto nella sezione Materiali e Metodi (Roberts M et al., 2001): la procedura prevede la biotinilazione delle proteine cellulari con uno specifico reagente (sulfo-NHS-SS-biotina), poi una soluzione contenente mercaptoetansulfonato rimuove la biotina solo dalle proteine presenti sulla superficie cellulare. Le proteine che restano biotinilate sono perciò solo quelle all'interno della cellula, che non sono influenzate dal trattamento con il mercaptoetansulfonato, queste possono essere immunoprecipitate, utilizzando la resina streptavidina-agarosio, e analizzate mediante Western Blot.

Le cellule sono state starvate 24 ore, poi marcate con la sulfo-NHS-SS-biotina per 5 minuti, è stata fatta una stimolazione a diverse concentrazioni di PDGF (2, 5 e 30 ng/ml) per i tempi indicati (5 e 15 minuti) e le cellule sono poi state trattate come descritto precedentemente (Materiali e Metodi). I lisati sono stati analizzati mediante Western Blot e riconosciuti con anticorpi per il PDGF-R e per l'actina (*fig.37*).



*Figura 37. Internalizzazione del PDGF-R in seguito a stimolazione con PDGF: le cellule NIH3T3 sono state stimulate con 2, 5 e 30 ng/ml di PDGF ai tempi indicati e trattate come descritto, per determinare la quantità di PDGF-R internalizzato. Le proteine biotinite sono state precipitate con l'avidina e i campioni lisati in Sample Buffer e analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-PDGF-R e anti-actina. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.*

Questo risultato conferma che stimolazioni con alte concentrazioni di PDGF inducono un'internalizzazione del recettore molto più intensa rispetto alle basse concentrazioni. Questo dato è in accordo anche con quanto visto nel primo esperimento, dove si evidenziava come una stimolazione di 1 ora con 30 ng/ml di PDGF causasse una *down*-regolazione nell'espressione del PDGF-R, cosa che non avviene invece con basse concentrazioni di ligando. Il recettore, infatti, per essere degradato deve essere internalizzato e alte concentrazioni di PDGF causano una maggior internalizzazione del recettore rispetto alle basse concentrazioni.

### **Ruolo di CME e RME nella segnalazione del PDGF-R**

L'endocitosi degli RTK può avvenire mediante due diversi meccanismi: un'endocitosi mediata da clatrina (CME), e un'endocitosi indipendente da clatrina che coinvolge domini della membrana ricchi in colesterolo, come i *raft* e le caveole (RCE). Recentemente Sigismund S. et al. (Sigismund S et al., 2005) hanno dimostrato che l'EGF-R, a basse concentrazioni di ligando, viene internalizzato esclusivamente mediante la CME, mentre ad alte concentrazioni di ligando l'EGF-R segue anche un'endocitosi raft-mediata (RME); secondo questi autori, la RME sarebbe responsabile dell'endocitosi che porta a degradazione, mentre la CME sarebbe coinvolta nel processo fisiologico di ricircolo del recettore sulla membrana.

Per studiare il ruolo di questi due tipi di endocitosi ad alte e basse concentrazioni di PDGF e i loro effetti sul comportamento delle NIH3T3 abbiamo utilizzato due inibitori farmacologici, Filipina (0.25 µg/ml) e Nistatina (12,5 µg/ml), che interferiscono preferenzialmente con l'endocitosi non clatrina-mediata, e siRNA diretti verso la dinamina2, una GTPasi coinvolta principalmente nell'endocitosi mediata da clatrina.

Utilizzando i siRNA abbiamo ottenuto una riduzione dell'espressione della proteina del 50-60% dopo tre giorni di trasfezione rispetto a cellule non trattate con i relativi siRNA (*fig 38*).

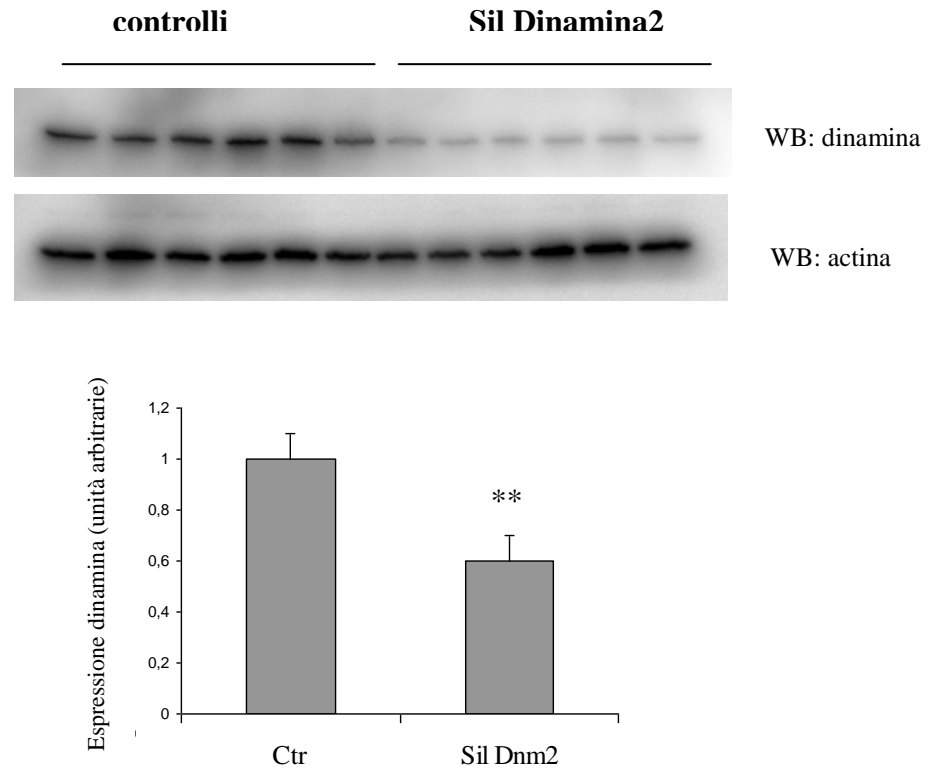


Figura 38. Silenziamento della dinamina: cellule NIH3T3 sono state trasfettate con siRNA rivolti verso la dinamina2, il silenziamento della proteina è stato valutato lisando cellule di controllo e cellule trasfettate dopo 72 ore, i campioni sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-dinamina2. Il diagramma riporta i valori medi della quantificazione dell'intensità delle bande, normalizzate sull'actina, i risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti, \*\*  $P < 0,001$ .

Utilizzando i composti Filipina e Nistatina e i siRNA diretti contro la Dinamina2, abbiamo studiato il ruolo dei due diversi tipi di endocitosi negli effetti fenotipici indotti da PDGF.

#### CME e migrazione cellulare

Per prima cosa abbiamo analizzato la migrazione cellulare indotta nelle NIH3T3 da basse concentrazioni di PDGF: sono stati effettuati dei test di *wound healing* su cellule silenziate per la dinamina2, a tre giorni dalla trasfezione, e su cellule pretrattate 1 ora con gli inibitori della RME (fig.39).

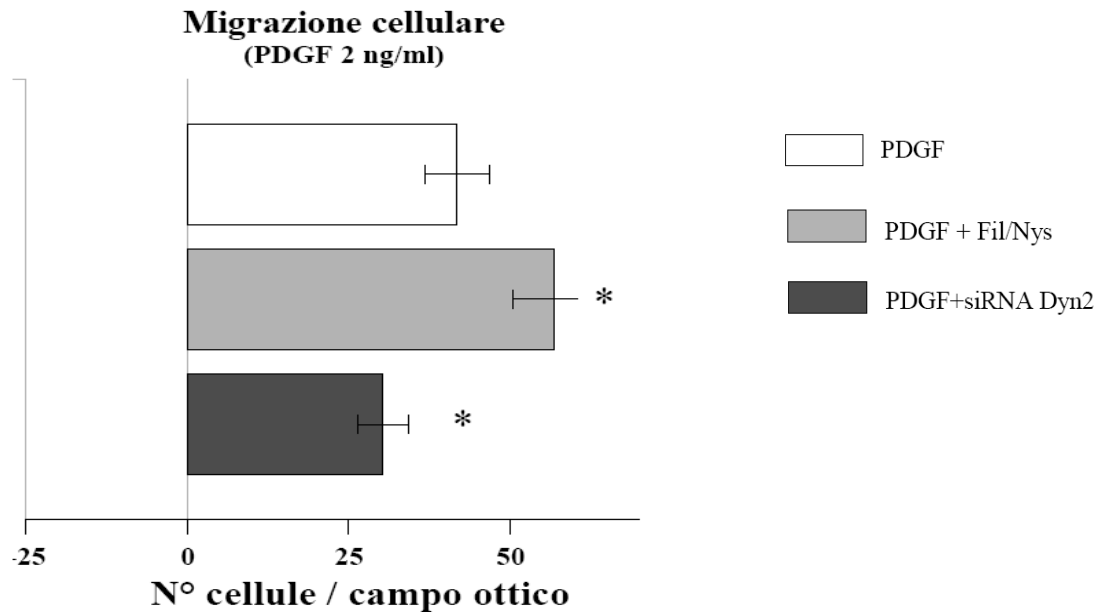


Figura 39. Test di wound healing su cellule NIH3T3 trasfettate con siRNA per la Dinamina2 o trattate con inibitori Filipina e Nistatina. Dopo 24 ore di starvazione è stata rimossa una striscia uniforme di cellule dalla zona centrale con una punta sterile, dopodiché le cellule sono state stimulate con 2 ng/ml di PDGF. Dopo 17 ore le cellule migrate nella striscia centrale sono state osservate al microscopio e contate, è stata calcolata una media di cellule migrate su almeno 15 campi ottici. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti, \*  $P < 0,05$ .

Dal test di migrazione si può vedere come nelle cellule silenziate per la dinamina2 e stimulate con 2 ng/ml di PDGF ci sia una forte inibizione della capacità di migrare e quindi un numero notevolmente ridotto di cellule presenti nella striscia centrale. Questo suggerisce quindi un coinvolgimento della CME nella migrazione cellulare. Un altro dato interessante è che le cellule trattate con gli inibitori della RME mostrano una capacità di migrare maggiore rispetto ai controlli. Questo effetto può essere spiegato considerando che un blocco della RME verosimilmente può causare un aumento di altri tipi di endocitosi (come la CME), che favoriscono una risposta di migrazione.

#### RME e proliferazione cellulare

Per studiare la proliferazione cellulare sono stati condotti dei test di crescita: cellule pretrattate con inibitori della RME o silenziate per la Dinamina2 sono state stimulate con concentrazioni proliferative di PDGF (30 ng/ml) per 24 ore e trattate poi con il cristal violetto, come descritto precedentemente (fig.40).

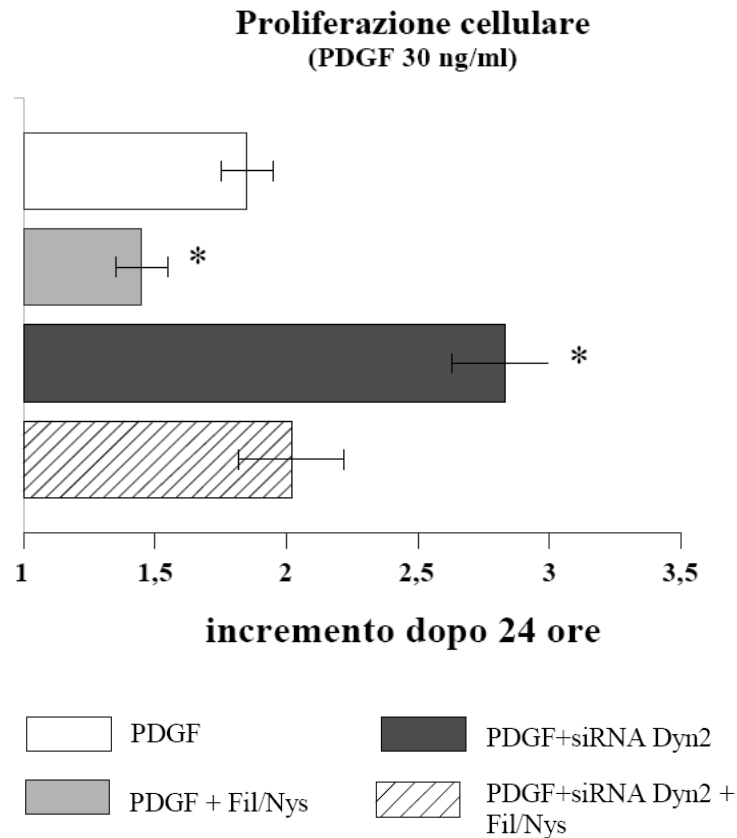


Figura 40. Proliferazione cellulare delle NIH3T3 dopo 24 ore di stimolazione con 30 ng/ml di PDGF: cellule trasfettate con i siRNA della dinamina2 per tre giorni e/o trattate con gli inibitori Filipina e Nistatina per un'ora prima della stimolazione, sono state starvate 24 ore e poi stimolate con 30 ng/ml di PDGF per 24 ore. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti, \*  $P < 0,05$ .

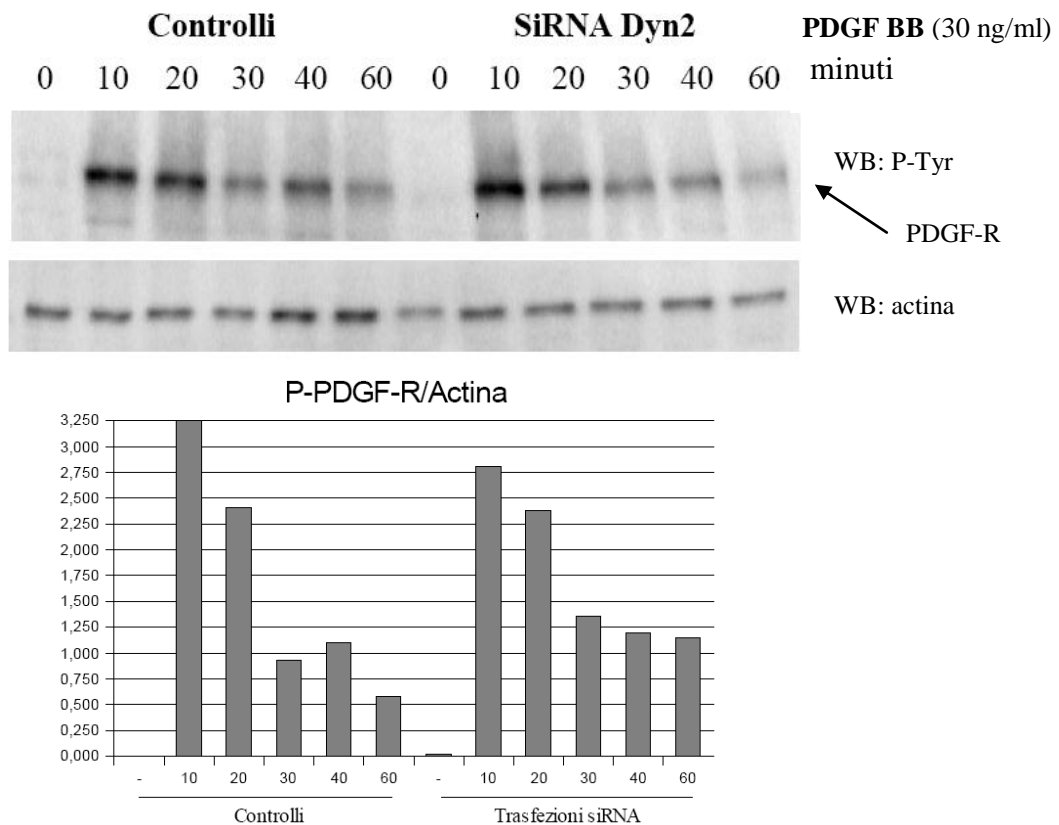
L'inibizione della RME ottenuta con gli inibitori comporta una significativa riduzione della proliferazione cellulare, mentre cellule silenziate per la dinamina2, in cui quindi viene bloccata la CME, mostrano un incremento della proliferazione cellulare rispetto al controllo.

Questi risultati dimostrano che la RME è fondamentale nell'induzione mitogenica da parte del PDGF. Anche in questo caso l'effetto pro-proliferativo dato dall'inibizione della CME potrebbe essere spiegato da un aumento dell'endocitosi mediata da raft (RME), quando l'altra via è bloccata. Questa ipotesi è confermata dal fatto che cellule NIH3T3 trattate sia con siRNA per la dinamina2 che con gli inibitori hanno un comportamento simile a quello del controllo: la RME potrebbe quindi essere responsabile della proliferazione maggiore delle cellule silenziate per la dinamina2.

### Attivazione e segnalazione del PDGF-R

I due tipi di endocitosi (CME e RME) sono perciò responsabili delle diverse risposte fenotipiche di migrazione e proliferazione indotte dalla stimolazione con PDGF.

Il meccanismo per cui i diversi tipi di endocitosi sono in grado di regolare il fenotipo cellulare può essere dovuto ad un'interferenza sull'attivazione del recettore o sulla sua segnalazione a valle. Abbiamo analizzato la tempo-dipendenza della fosforilazione del recettore in cellule trasfettate con siRNA per la dinamina2 o pretrattate con gli inibitori della RME, per vedere come i due meccanismi influenzassero l'attivazione del recettore. Cellule NIH3T3, trasfettate con siRNA per la dinamina2 per tre giorni o pre-trattate un'ora con gli inibitori Filipina e Nistatina, sono state stimolate con una concentrazione proliferativa di PDGF BB (30 ng/ml) per tempi crescenti. Le cellule sono state lisate e analizzate mediante Western Blot con anticorpi anti-fosfo-tirosina e anti-actina (*fig.41,42*).



*Figura 41. Fosforilazione tempo-dipendente del PDGF-R in cellule di controllo e silenziate per la dinamina2. Cellule NIH3T3 sono state trasfettate con siRNA per la dinamina2 tre giorni prima dell'esperimento, sono state stravate 24 ore e poi stimolate con 30 ng/ml di PDGF per i tempi indicati. I lisati sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-P-Tyr e normalizzati sull'actina. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.*

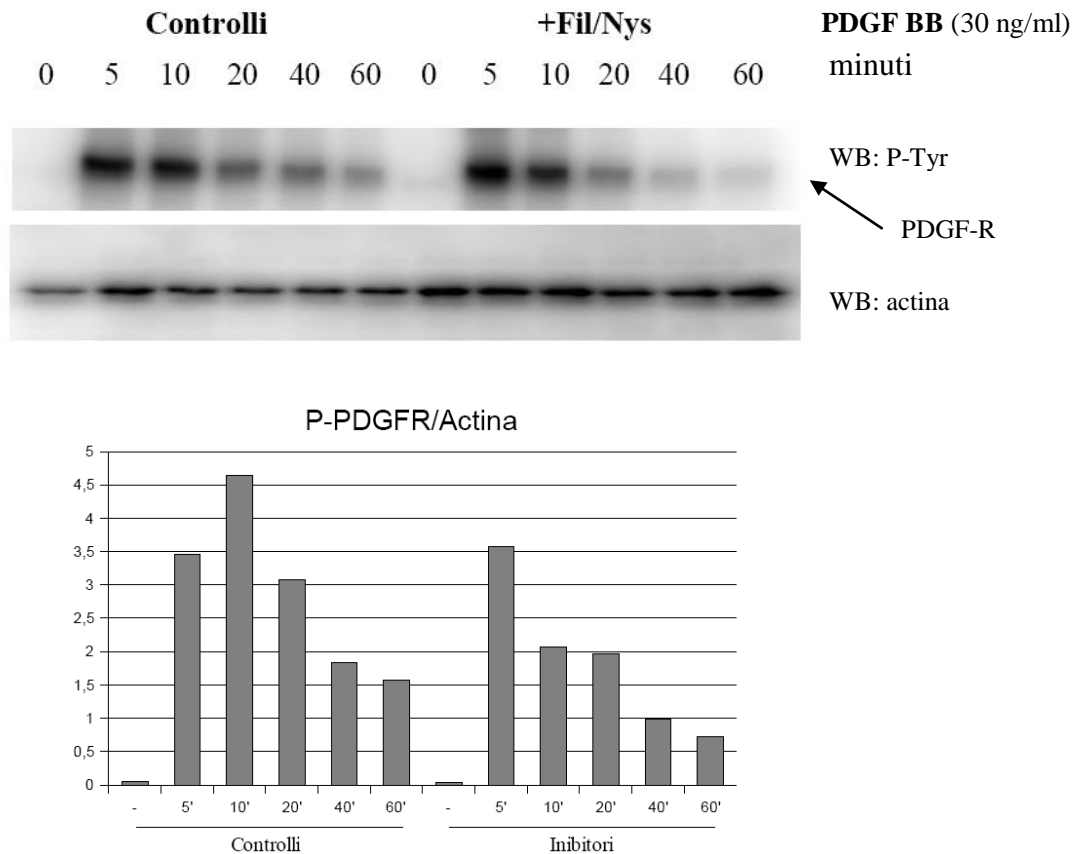


Figura 42. Fosforilazione tempo-dipendente del PDGF-R in cellule di controllo e con inibitori della RME. Cellule NIH3T3 sono state starvate 24 ore, poi pretrattate un'ora con Filipina e Nistatina, quindi stimulate con 30 ng/ml di PDGF per i tempi indicati. I lisati sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-P-Tyr e normalizzati sull'actina. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

I meccanismi di endocitosi tramite CME e RME sembrano non interferire sull'attivazione del recettore: infatti, sia nelle cellule trasfettate con siRNA per la dinamina2, sia in quelle trattate con gli inibitori non si evidenziano differenze significative nell'attivazione del recettore rispetto al controllo (fig.41,42). Si ha sempre un aumento della fosforilazione del PDGF-R, con un picco a 10 minuti, dopodiché la fosforilazione diminuisce, questo è dovuto anche alla degradazione del recettore in seguito a stimolazioni con alte concentrazioni di PDGF, come visto nel primo esperimento.

Abbiamo studiato quindi il coinvolgimento dei due meccanismi di endocitosi nell'attivazione delle vie specifiche che stimolano la proliferazione cellulare, andando a misurare la fosforilazione delle ERK 1 e 2.

Cellule NIH3T3 sono state trattate come descritto nell'esperimento precedente: ovvero trasfettate con siRNA per la dinamina2 o pretrattate con gli inibitori Filipina e Nistatina, quindi stimulate con 30 ng/ml di PDGF. I campioni sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-P-ERK e anti-ERK (fig.43,44).

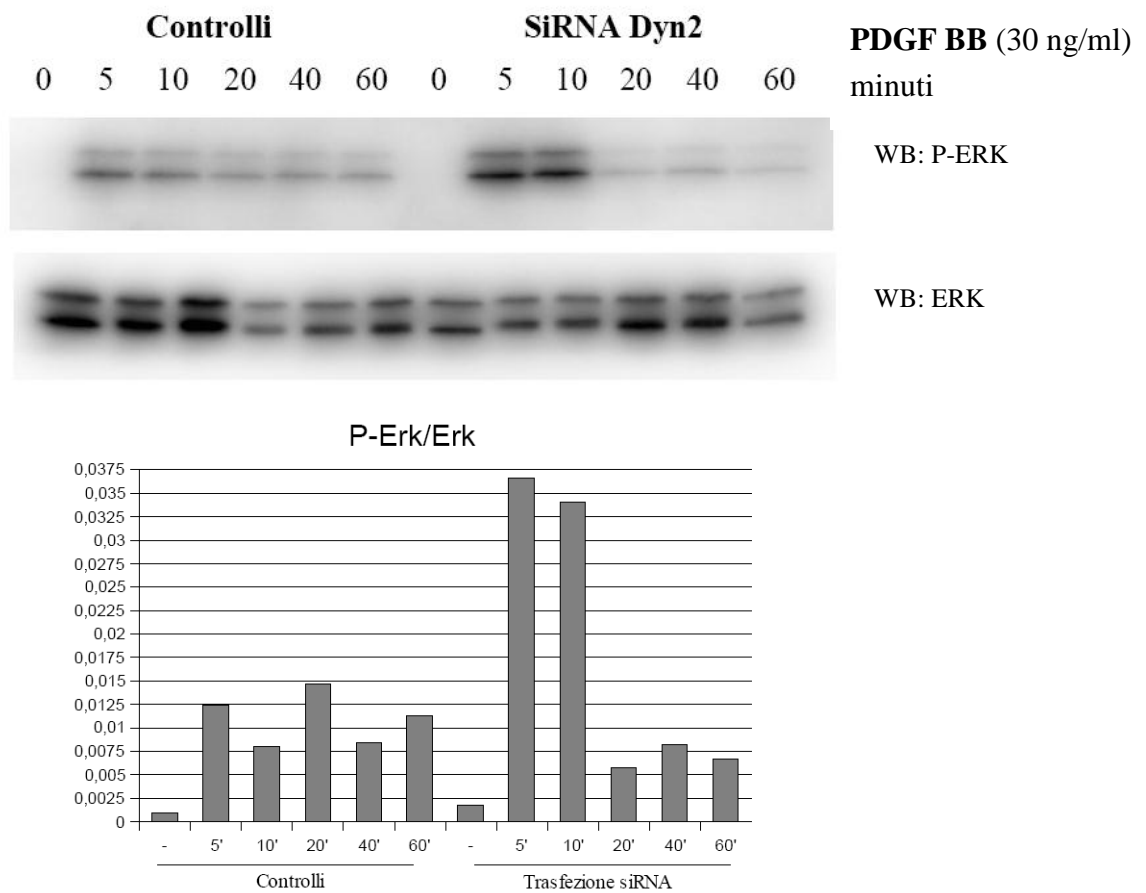


Figura 43. Fosforilazione tempo-dipendente delle ERK 1 e 2 in cellule di controllo e silenziate per la dinamina2. Cellule NIH3T3 sono state trasfettate con siRNA per la dinamina2 tre giorni prima dell'esperimento, sono state stravate 24 ore e poi stimulate con 30 ng/ml di PDGF per i tempi indicati. I lisati sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-P-ERK e normalizzati sulla quantità totale di ERK 1 e 2. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

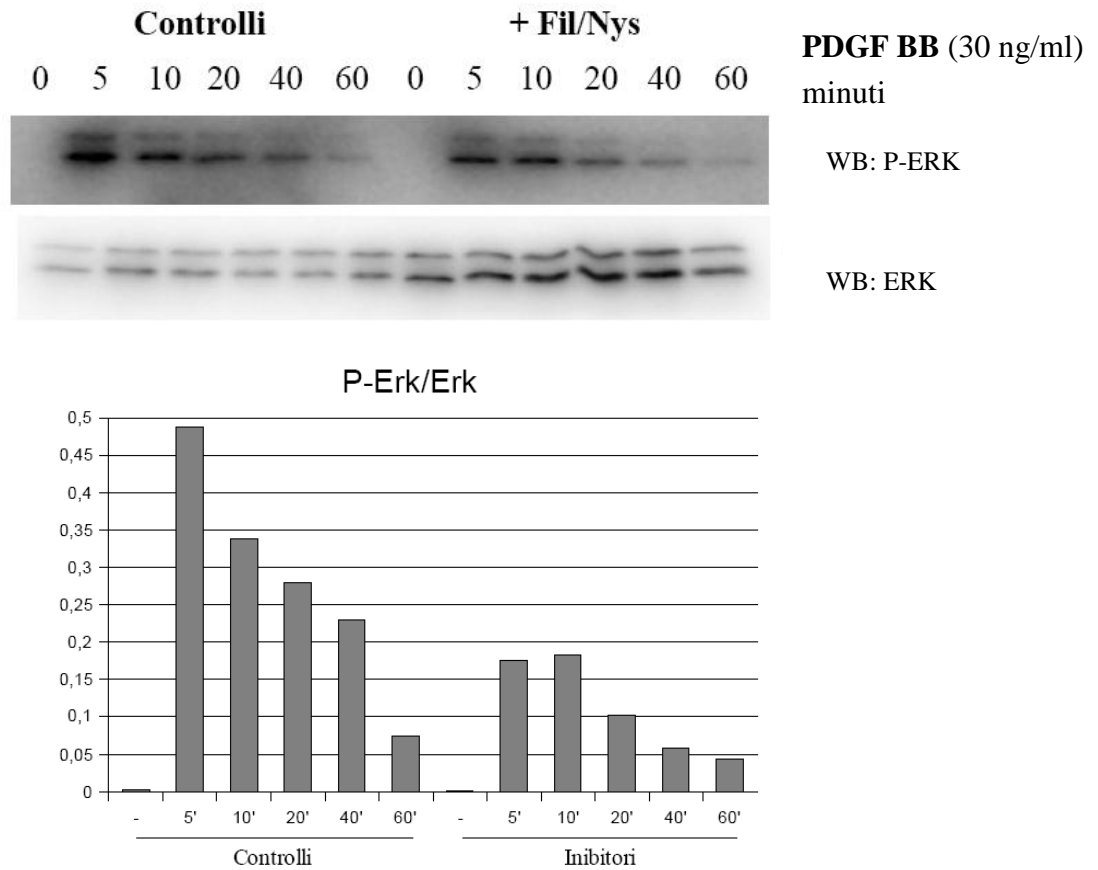


Figura 44. Fosforilazione tempo-dipendente delle ERK 1 e 2 in cellule di controllo e con inibitori della RME. Cellule NIH3T3 sono state starvate 24 ore, poi pretrattate un'ora con Filipina e Nistatina, quindi stimulate con 30 ng/ml di PDGF per i tempi indicati. I lisati sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-P-ERK e normalizzati sulla quantità totale di ERK 1 e 2. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

La fosforilazione delle ERK 1 e 2 è nettamente influenzata dall'inibizione di uno o dell'altro tipo di endocitosi: nelle cellule silenziate per la dinamina2 la fosforilazione delle ERK è fortemente aumentata rispetto al controllo, invece, nelle cellule trattate con gli inibitori della RME, queste cinasi sono attivate solo debolmente e la fosforilazione è dimezzata rispetto al controllo.

Questa risposta concorda con quanto era emerso dai test di crescita: la RME è responsabile dell'attivazione delle vie di segnalazione che portano all'induzione della mitosi, e conferma l'ipotesi secondo la quale la RME non è solo una semplice via di degradazione del recettore, ma rappresenta anche una parte importante del processo proliferativo.

Poiché la fosforilazione del PDGF-R non è influenzata dall'inibizione di uno o dell'altro tipo di endocitosi, mentre si ha un effetto evidente sull'attivazione delle vie specifiche che portano alla proliferazione cellulare, la nostra ipotesi è che l'attivazione della segnalazione che induce la mitogenesi sia regolata fondamentalmente dalla localizzazione del recettore all'interno della cellula.

## DISCUSSIONE

Il PDGF-R è un recettore tirosino-cinasi che riveste un ruolo fondamentale nel promuovere e regolare molti aspetti della fisiologia cellulare, come la mitosi, la migrazione, il metabolismo e il differenziamento. Fra le risposte indotte dal PDGF, la proliferazione e la migrazione sono mutuamente esclusive, quindi in ogni momento una singola cellula potrà attivare solo una delle due risposte. Per chiarire questa contraddizione abbiamo sviluppato un modello molto semplice, secondo il quale la risposta fenotipica di una data cellula dipende essenzialmente dalla concentrazione di PDGF presente nell'ambiente.

La fosforilazione del PDGF-R cresce linearmente in funzione della concentrazione di PDGF, invece le risposte scatenate nella cellula non si comportano nello stesso modo. Basse concentrazioni di PDGF (sotto i 2 ng/ml) non sono in grado di indurre una risposta proliferativa, però sono efficaci nel promuovere la migrazione cellulare, molto più di quanto facciano le concentrazioni più alte, come è dimostrato dal test di *wound healing* e dal test di migrazione bi-dimensionale. Al contrario, le alte concentrazioni di PDGF (30 ng/ml) inducono una forte proliferazione cellulare, come è visibile dai test di crescita, ma hanno un effetto minore nello stimolare la migrazione. Il passaggio da una risposta fenotipica all'altra, in funzione della concentrazione di PDGF, procede senza soluzione di continuità, infatti ad esempio una stimolazione con 5 ng/ml di PDGF è capace di indurre sia la proliferazione che la migrazione cellulare. Una spiegazione plausibile di questo fenomeno può essere che, in tali condizioni, alcune cellule attivino una risposta fenotipica, mentre altre seguano un comportamento diverso.

Delle vie di segnalazione attivate dal PDGF-R e coinvolte nella progressione del ciclo cellulare, quella di ERK segue lo stesso andamento dell'attivazione dose-dipendente del PDGF-R, mentre la via di PI-3K/Akt è attiva già per concentrazioni più basse (2-5 ng/ml). Questo è probabilmente dovuto al fatto che Akt non è coinvolta solo nell'induzione della mitosi, ma anche nella sopravvivenza cellulare, quindi la sua attivazione può essere necessaria anche a basse concentrazioni di PDGF. L'attivazione delle proteine FAK, Rho e Rac1, che funzionano da mediatori del rimodellamento del citoscheletro e della migrazione cellulare, è evidente soprattutto a basse concentrazioni di PDGF, che sono infatti le condizioni favorevoli

per la migrazione, mentre ad alte concentrazioni di PDGF, quando prevale la segnalazione mitogenica, la loro attività è molto bassa.

Il PDGF-R quindi è in grado di attivare due risposte cellulari differenti e, per molti aspetti, opposte, in base alla concentrazione di PDGF presente nell'ambiente. Per spiegare questo fenomeno abbiamo sviluppato due ipotesi. La prima è un'ipotesi "qualitativa", secondo la quale la fosforilazione in tirosina del PDGF-R sarebbe diversa in funzione delle diverse concentrazioni di PDGF, e in questo modo il recettore sarebbe in grado di attivare differenti molecole segnale. La seconda è un'ipotesi "quantitativa", ovvero il recettore sarebbe attivato sempre nello stesso modo, indipendentemente dalla concentrazione di ligando (cioè vengono fosforilate le stesse tirosine), ma la concentrazione di PDGF può influenzare il numero di recettori attivati. I nostri risultati hanno permesso di scartare la prima ipotesi, infatti analizzando la fosforilazione di cinque diverse tirosine del recettore, in funzione della concentrazione del ligando non si evidenziano differenze apprezzabili.

Gli RTK, dopo essere stati attivati e aver innescato le vie di segnalazione specifiche, vengono in parte internalizzati: questo evento è collegato alla successiva ubiquitinazione e degradazione proteasoma-dipendente, ma è stato dimostrato che l'endocitosi svolge un ruolo importante anche nella segnalazione degli RTK. Per quello che riguarda il PDGF-R, è stato dimostrato che la segnalazione del PDGF-R all'interno degli endosomi è in grado di attivare le principali vie di segnalazione coinvolte nella proliferazione cellulare. Nel nostro lavoro abbiamo dimostrato che questa segnalazione endosomica non è solo sufficiente, ma anche necessaria per l'attivazione della proliferazione cellulare.

Innanzitutto abbiamo dimostrato che l'internalizzazione del PDGF-R dipende dalla concentrazione del ligando: una stimolazione con 30 ng/ml di PDGF induce un'endocitosi molto più intensa di quella provocata da concentrazioni di 2 o 5 ng/ml. In un lavoro di Sigismund del 2005 (Sigismund S et al., 2005) è stato osservato che l'endocitosi dell'EGFR avviene attraverso due meccanismi diversi: a basse concentrazioni di ligando l'internalizzazione dell'EGF-R dipende esclusivamente dalla via clatrina-mediata (CME), invece, ad alte concentrazioni di EGF l'internalizzazione del recettore segue anche l'endocitosi mediata da rafts (RME). Abbiamo bloccato selettivamente la CME, silenziando l'espressione della dinamina-2 con specifici siRNA, e la RME, utilizzando gli inibitori farmacologici Filipina e Nistatina, e studiato quindi il comportamento cellulare a basse ed alte concentrazioni

di PDGF. I risultati ottenuti suggeriscono che, in base alla concentrazione di ligando, ci sia un bilanciamento fra queste due vie di endocitosi, che determina la diversa risposta cellulare. La CME svolge un ruolo essenziale a basse concentrazioni di PDGF, quando prevale la migrazione cellulare, infatti nelle cellule in cui la dinamina-2 è silenziata, la migrazione è inibita. Cellule trattate con Filipina e Nistatina mostrano un incremento significativo della migrazione cellulare, e questo può far pensare che, se la RME è bloccata, la via clatrina-mediata viene intensificata e questo porta ad una maggior migrazione cellulare.

Ad alte concentrazioni di PDGF, quando prevale invece la proliferazione, l'inibizione della RME comporta una riduzione della proliferazione cellulare, dimostrando quindi che questa è una via essenziale nella mitogenesi indotta da PDGF-R. La degradazione del PDGF-R rappresenta quindi solo una conseguenza e non lo scopo principale dell'endocitosi mediata da RME. Cellule trasfettate con siRNA per la dinamina-2, nelle quali quindi è inibita la CME, se stimolate ad alte concentrazioni di PDGF, mostrano un forte incremento della proliferazione cellulare rispetto al controllo. Parallelamente a quanto detto prima, l'inibizione della CME può indurre un aumento dell'internalizzazione del PDGF-R tramite RME, causando quindi un maggior effetto proliferativo. Questa ipotesi è confermata dal fatto che le cellule trasfettate con siRNA per la dinamina-2 e trattate anche con Filipina e Nistatina mostrano una risposta proliferativa simile al controllo, indicando quindi che la RME è la responsabile della maggior proliferazione nelle cellule in cui è inibita la CME.

In conclusione, il PDGF-R sembra avere due diverse funzioni in base alla concentrazione di ligando presente nell'ambiente. Come per l'EGF, basse concentrazioni di PDGF inducono esclusivamente la CME, che è responsabile della migrazione cellulare e non sembra essere coinvolta invece nello stimolo proliferativo; in queste condizioni il recettore si trova prevalentemente sulla superficie cellulare e agisce come un sensore, guidando la migrazione cellulare, la CME potrebbe quindi avere un ruolo nel rigenerare PDGF-R libero sulla membrana. Le basse concentrazioni di PDGF infatti non comportano una *down* regolazione del recettore, che è invece, molto evidente quando le cellule sono stimolate ad alte concentrazioni.

Ad alte concentrazioni di PDGF, invece, l'internalizzazione del PDGF-R è mediata anche dalla RME, che risulta essere necessaria per la proliferazione indotta da

PDGF. Il ruolo della RME nel mediare la risposta proliferativa è confermato anche dal fatto che bloccando questa via di endocitosi si ha un'evidente riduzione nella fosforilazione delle ERK 1 e 2, responsabili dell'induzione della mitosi, mentre non si hanno effetti apprezzabili sulla fosforilazione del PDGF-R. Il recettore quindi viene attivato indipendentemente dalla sua localizzazione cellulare, ma deve essere internalizzato e spostato verso compartimenti cellulari diversi per poter attivare le vie di segnalazione specifiche della mitosi.

La segnalazione "dualistica" del PDGF-R perciò dipende dalla concentrazione di PDGF percepita da ogni singola cellula: basse concentrazioni inducono una migrazione direzionale verso la sorgente del ligando, quando le cellule, migrando lungo il gradiente, trovano una concentrazione di PDGF sufficiente a indurre la proliferazione, smettono di muoversi ed entrano in mitosi. Questo modello può essere applicato a diverse situazioni fisiologiche e patologiche come la riparazione di una ferita, l'angiogenesi o la formazione di metastasi e probabilmente può descrivere bene il comportamento anche di molti altri RTK.

## **2. LA BASSA TENSIONE DI OSSIGENO COME FATTORE DI QUIESCENZA PER CELLULE NON TRASFORMATE**

### **SCOPO DEL LAVORO**

La maggior parte degli organismi esistenti ha bisogno dell'ossigeno molecolare (O<sub>2</sub>) per sopravvivere. L'O<sub>2</sub> rappresenta un parametro ambientale molto importante per il metabolismo cellulare, è utilizzato come principale accettore di elettroni in molte reazioni biochimiche ed è sfruttato dai mitocondri per generare ATP nella fosforilazione ossidativa. Variazioni nella concentrazione di ossigeno provocano alterazioni della fisiologia cellulare, gli organismi superiori hanno infatti sviluppato diversi meccanismi di adattamento per mantenere l'omeostasi dell'ossigeno, ad esempio regolano la respirazione, la vasodilatazione e il metabolismo glicolitico in base alla disponibilità di ossigeno nell'ambiente. Da sempre la bassa tensione di ossigeno è stata associata prevalentemente a condizioni patologiche, come l'ischemia, l'infiammazione, o la progressione tumorale, infatti nelle masse tumorali non vascolarizzate si formano zone ipossiche, che sembrano favorire la progressione del tumore e lo sviluppo delle metastasi. Nonostante questo, microambienti ipossici si possono venire a creare anche nell'embrione o nell'organismo adulto, e possono formare nicchie specifiche che regolano il differenziamento cellulare.

Nella bibliografia corrente è comunemente considerata "normossia" una tensione parziale di ossigeno pari a 20 kPa (~ 20%), ovvero la pressione parziale di ossigeno nell'atmosfera; il termine "ipossia" definisce una carenza nel normale apporto di ossigeno alle cellule, generalmente viene usata per indicare una concentrazione di O<sub>2</sub> vicina all'1%, ma alcuni autori considerano ipossia già valori al sotto del 5% di O<sub>2</sub>. In realtà, la concentrazione di ossigeno fisiologica è molto variabile nei diversi tipi cellulari ed è ben diversa da quella atmosferica del 20-21%. La pressione di ossigeno all'interno dell'organismo non arriva mai a valori vicini al 20%, infatti già negli alveoli polmonari, che rappresentano i tessuti più ossigenati, si trovano valori intorno al 13%, a livello dei capillari periferici è stato calcolato che la tensione di ossigeno

sia circa dell'8%, a livello tissutale, considerando il consumo e la diffusione, la percentuale di ossigeno nell'ambiente scende ancora (fig.45).

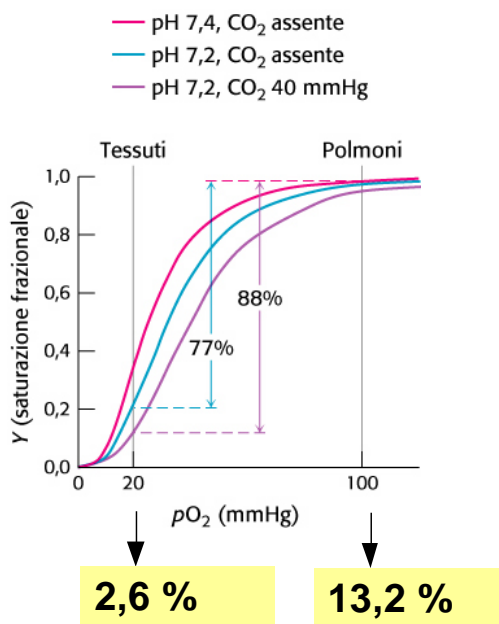


Figura 45. Variazioni della concentrazione di ossigeno all'interno dell'organismo: dagli alveoli polmonari che presentano una tensione di ossigeno pari al 13%, nei tessuti la concentrazione scende fino a valori intorno al 2%.

L'ossigeno è un gas e come tale entra nelle cellule per semplice diffusione secondo gradiente, i capillari perciò cedono ossigeno ai tessuti finché le concentrazioni di ossigeno nel sangue e nel tessuto non si trovano in equilibrio. La tensione di ossigeno presente nei capillari può darci quindi una stima della concentrazione di ossigeno presente nel tessuto. Abbiamo visto che nei capillari arteriosi la tensione di ossigeno è pari all'8%, nei capillari venosi invece la tensione si aggira intorno a valori del 2%, questa deve essere perciò la concentrazione minima di ossigeno presente nel tessuto. Possiamo considerare che nelle immediate vicinanze del vaso la concentrazione di ossigeno nelle cellule sia pari al valore massimo dell'8%, poi, man mano che ci si allontana dal vaso, la percentuale di ossigeno scende a causa sia della diffusione, sia del consumo da parte delle cellule. La superficie di tessuto che deve essere raggiunta dall'ossigeno rilasciato dal vaso arterioso aumenta al crescere della distanza, perciò la concentrazione di ossigeno scende rapidamente, decrescendo secondo il quadrato della distanza. Quindi possiamo calcolare che, se l'ossigeno rilasciato dal vaso è ad una concentrazione dell'8%, al secondo strato di cellule la tensione di ossigeno

scende già al 4,7%, al terzo strato è intorno al 3% e tende rapidamente a qual valore del 2% riscontrato nei capillari venosi (fig.46). Quindi le cellule esposte a concentrazioni di ossigeno superiori al 3% sono solo una piccola percentuale, mentre circa il 90% si trova a concentrazioni di ossigeno inferiori al 3%.

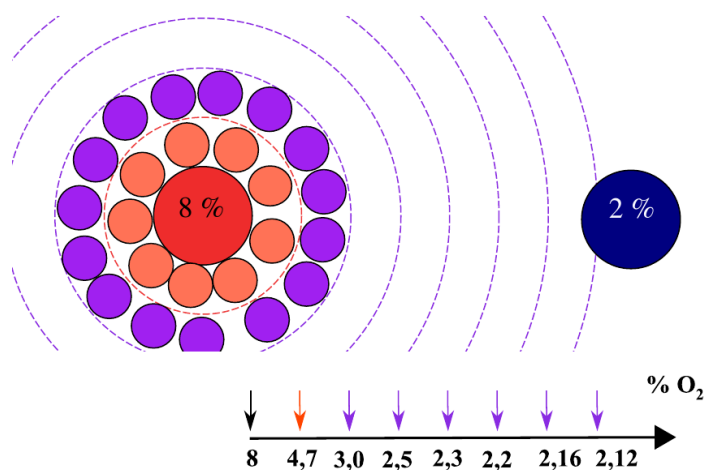


Figura 46. Modello sperimentale della diffusione di ossigeno: nei vasi c'è una tensione di ossigeno dell'8%, allontanandosi dal vaso la concentrazione diminuisce con il quadrato della distanza, il 90% delle cellule di un tessuto percepisce quindi una concentrazione minore del 3%.

Nel nostro modello sperimentale abbiamo utilizzato fibroblasti murini NIH3T3, e considerato valori dall'1 al 3% di ossigeno non come ipossici, ma come condizioni fisiologiche di normossia; invece, alte concentrazioni di ossigeno, come quella del 20%, mimano una condizione di iperossia, che si può venire a creare solo in situazioni particolari, ad esempio nel caso di una ferita, in cui il tessuto viene esposto all'ambiente esterno e si crea un gradiente nella tensione di ossigeno.

I nostri risultati hanno dimostrato come le cellule connettivali siano sostanzialmente quiescenti in condizioni di bassa tensione di ossigeno, infatti sia la proliferazione che la migrazione cellulare sono ridotte e l'espressione di recettori per fattori di crescita, come il PDGF-R, è molto attenuata; un'esposizione ad alte concentrazioni di ossigeno provoca invece un aumento delle risposte cellulari.

Il principale responsabile delle risposte indotte dall'ipossia è HIF: dai nostri dati emerge come HIF-1 $\alpha$  non sia coinvolto in questo stato di quiescenza cellulare indotto alle basse tensioni di O<sub>2</sub>, mentre sembra essere HIF-2 $\alpha$  il principale responsabile di questo fenomeno.

## RISULTATI

### **Proliferazione cellulare in funzione della concentrazione di O<sub>2</sub>**

Dalla letteratura è noto che per le cellule tumorali la bassa tensione di ossigeno costituisce un vantaggio selettivo, infatti l'ipossia sembra favorire la progressione neoplastica e la formazione di metastasi. Poco si sa invece di quale sia la risposta delle cellule non trasformate a variazioni della tensione di ossigeno.

Come modello di cellule connettivali non trasformate abbiamo utilizzato cellule NIH3T3, queste sono state coltivate sia in condizioni di alta pressione di O<sub>2</sub> al 20%, sia in condizioni di bassa pressione, in un incubatore da ipossia, all'1% o al 3%. Le cellule sono state stimolate con concentrazioni basse di PDGF-BB per indurre la migrazione cellulare e con concentrazioni alte di PDGF-BB o con siero per provocare una risposta proliferativa.

Per prima cosa abbiamo analizzato la proliferazione cellulare dei fibroblasti in funzione della concentrazione di ossigeno. Cellule NIH3T3 sono state piastrate in numero di circa  $5 \times 10^5$  e messe in coltura parallelamente al 20% e all'1% di ossigeno per 3 giorni; quindi sono state starvate 24 ore prima di essere stimolate con siero CALF al 10% o con una concentrazione di PDGF di 30 ng/ml per 24 ore. Il test di crescita è stato effettuato utilizzando la marcatura con CFSE (*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) e la successiva analisi citofluorimetrica (fig 47,48).

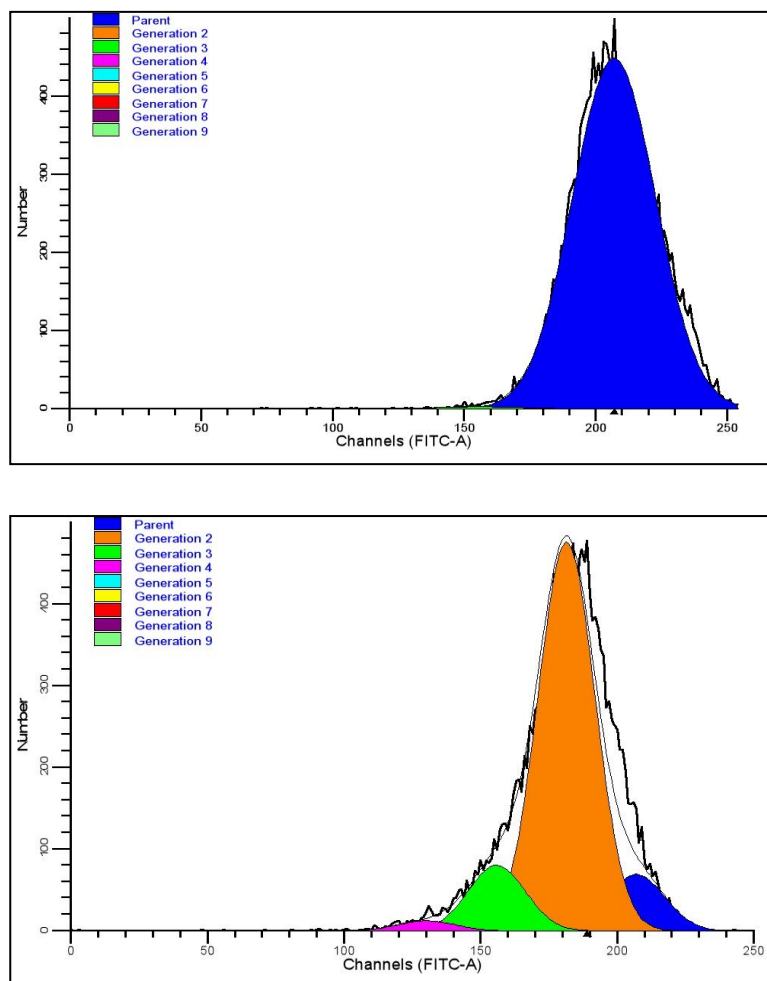


Figura 47. Analisi citofluorimetrica di cellule marcate con CFSE: le cellule vengono colorate con la sonda fluorescente, poi in parte bloccate subito, in parte stimolate per 24 ore. Le cellule vengono staccate, fissate in paraformaldeide e analizzate al citofluorimetro. Le cellule bloccate al tempo 0 sono marcate uniformemente, costituiscono una popolazione omogenea, quindi formano un picco unico, le cellule bloccate dopo 24 ore di stimolazione mostrano diversi picchi di fluorescenza corrispondenti alle diverse generazioni. L'analisi con il software ModFit permette di ricavare le percentuali di cellule delle diverse generazioni e l'indice di proliferazione cellulare.

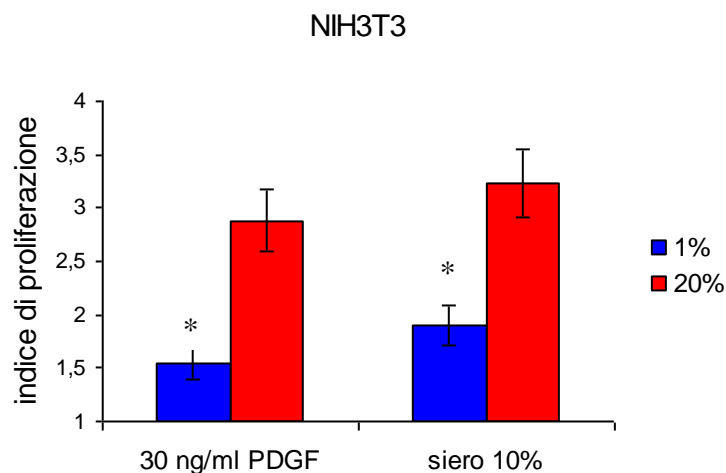


Figura 48. Proliferazione cellulare nelle NIH3T3: le cellule sono state coltivate parallelamente all'1% e al 20% di O<sub>2</sub> per 3 giorni, starvate 24 ore, poi stimolate con siero CALF al 10% o PDGF 30 ng/ml. L'indice di proliferazione è stato determinato utilizzando il CFSE, le cellule sono state marcate con la sonda fluorescente prima di essere stimolate, 24 ore dopo la stimolazione sono state staccate, fissate in paraformaldeide al 3% e analizzate al citofluorimetro. In grafico è riportato l'indice di proliferazione calcolato su una media di 5 esperimenti, \*  $P < 0,01$  rispetto al 20%.

Il test di crescita mostra come nelle NIH3T3 la bassa tensione di ossigeno (1%) causi un tasso di proliferazione nettamente più basso rispetto a quello ottenuto per cellule coltivate ad alte tensioni di ossigeno (20%), infatti la proliferazione risulta quasi dimezzata all'1%. L'effetto di inibizione della crescita è simile sia in risposta al siero che alla stimolazione con PDGF-BB, dimostrando quindi che l'effetto non è specifico di questo fattore di crescita, ma è probabilmente generalizzabile a molti dei fattori presenti nel siero (*fig 48*).

La crescita a basse tensioni di ossigeno è stata studiata sia in cellule coltivate all'1% che al 3% di ossigeno, con risultati molto simili: in entrambi i casi si osserva una crescita minore nelle cellule cresciute a bassa tensione di ossigeno rispetto a quelle mantenute al 20% di O<sub>2</sub>. D'ora in poi ci riferiremo sempre all'1% come condizione di bassa tensione di ossigeno, considerando che il 3% di ossigeno evoca risposte molto simili.

Le cellule non trasformate quindi rispondono alle basse tensioni di ossigeno con una ridotta proliferazione cellulare, al contrario di quanto è stato generalmente descritto per le cellule tumorali. Per confermare questa differenza abbiamo eseguito lo stesso test su cellule tumorali di melanoma derivanti da tumore primario (A375) o da metastasi (Hs29).

Le cellule sono state messe in coltura parallelamente al 20% e all'1% di ossigeno per 3 giorni, quindi trattate con la sonda fluorescente CFSE e tenute 24 ore in terreno con siero FCS al 10% (fig.49).

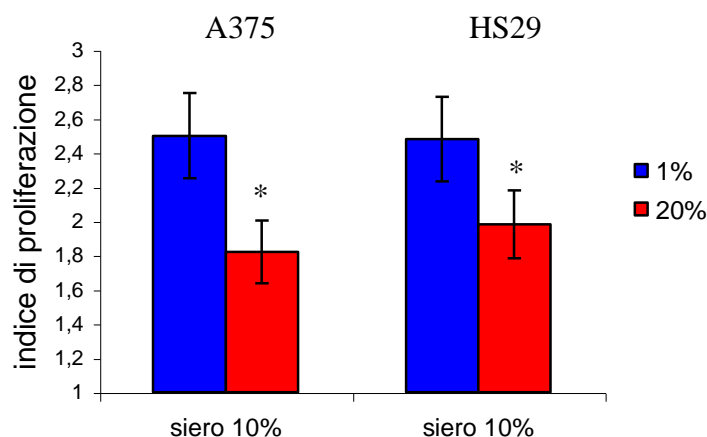


Figura 49. Proliferazione cellulare in cellule tumorali: cellule di melanoma derivanti da tumore primario (A375) e da metastasi (Hs29) sono state coltivate parallelamente all'1% e al 20% di O<sub>2</sub>, l'indice di proliferazione è stato determinato mediante marcatura con CFSE. Le cellule sono state trattate con la sonda fluorescente, poi messe in coltura in terreno con siero FCS al 10%, 24 ore dopo sono state staccate, fissate in paraformaldeide al 3% e analizzate al citofluorimetro. N=5 \* P<0,01 rispetto al 20%.

Le crescita delle cellule tumorali risulta effettivamente avvantaggiata dalle basse tensioni di ossigeno, infatti per entrambe le linee cellulari le cellule cresciute all'1% di ossigeno mostrano un indice di proliferazione nettamente più alto di quelle al 20%.

Una stimolazione con alte concentrazioni di PDGF induce nelle NIH3T3 una risposta di proliferazione, minore se le cellule sono coltivate a basse tensioni di ossigeno, maggiore se queste si trovano ad una concentrazione del 20% di O<sub>2</sub>. Per scoprire le basi di questa diversa risposta cellulare, abbiamo analizzato il ciclo cellulare di cellule coltivate nelle due condizioni di ossigeno, misurando la proliferazione indotta da PDGF, in funzione della dose e del tempo di stimolazione.

Cellule NIH3T3, coltivate al 20% o all'1% di ossigeno per 3 giorni, sono state stimulate con concentrazioni crescenti di PDGF, dopo 19 ore sono state lisate con una soluzione ipotonica contenente ioduro di propidio e i campioni analizzati al citofluorimetro (fig.50).

	1 % O <sub>2</sub>					
PDGF	0	2 ng	5 ng	10 ng	30 ng	100 ng
G1	91.76	92.46	90.51	92.2	83.28	79.8
S	7.0	7.0	9.5	6.44	16.7	20.2
G2 / M	1.2	0.5	0.0	1.4	0.0	0.0

	20 % O <sub>2</sub>					
PDGF	0	2 ng	5 ng	10 ng	30 ng	100 ng
G1	91.0	90.5	91.7	91.4	74.6	63.4
S	7.9	8.2	6.3	7.6	25.33	35.8
G2 / M	1.1	1.3	1.96	1.0	0.0	0.7

Figura 50. Dose-dipendenza della proliferazione indotta da PDGF ad alte e basse tensioni di O<sub>2</sub>: cellule NIH3T3, coltivate parallelamente al 20% e all'1% di ossigeno per 3 giorni, sono state starvate 24 ore e stimolate con concentrazioni crescenti di PDGF per 19 ore, poi lisate con la soluzione ipotonica contenente ioduro di propidio e analizzate al citofluorimetro. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Sia nelle cellule coltivate all'1% che in quelle al 20% di ossigeno, stimolazioni con basse concentrazioni di PDGF (<10 ng/ml) non provocano un aumento della proliferazione, infatti la percentuale di cellule in fase S è paragonabile a quella del controllo non stimolato. Stimolazioni con 30 e 100 ng/ml, invece, inducono un aumento netto della percentuale di cellule in fase S, con un incremento maggiore per le cellule coltivate ad alta tensione di ossigeno, confermando quanto visto nel test di crescita. L'analisi del ciclo dimostra che la dose proliferativa minima non è influenzata dalla tensione di ossigeno, infatti le concentrazioni di PDGF necessarie a far entrare le cellule in mitosi sono le stesse, quello che cambia invece, nelle due condizioni di crescita, è il numero di cellule che entrano in ciclo.

Successivamente, abbiamo analizzato la proliferazione indotta da PDGF nelle due condizioni di crescita in funzione del tempo di stimolazione. Le cellule sono state stimolate con una concentrazione proliferativa di PDGF (30 ng/ml) per tempi diversi, per valutare il tempo necessario all'ingresso delle cellule in fase S (fig.51).

	<b>20 % O<sub>2</sub></b>			
<b>tempo</b>	<b>0</b>	<b>14 h</b>	<b>15 h</b>	<b>16 h</b>
<b>G1</b>	92,37	90,96	80,84	75,65
<b>S</b>	5,87	9,04	19,16	24,35
<b>G2 / M</b>	1,77	0,0	0,0	0,0

	<b>1 % O<sub>2</sub></b>			
<b>tempo</b>	<b>0</b>	<b>14 h</b>	<b>15 h</b>	<b>16 h</b>
<b>G1</b>	90,92	95,84	94,95	92,26
<b>S</b>	6,5	4,16	5,55	7,74
<b>G2 / M</b>	2,59	0,0	0,0	0,0

*Figura 51. Tempo-dipendenza della proliferazione indotta da PDGF ad alte e basse tensioni di O<sub>2</sub>: cellule NIH3T3, coltivate al 20% o all'1% di ossigeno per 3 giorni, sono state starvate 24 ore e stimolate con 30 ng/ml PDGF, poi lisate a tempi diversi con la soluzione ipotonica di ioduro di propidio e analizzate al citofluorimetro. I dati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.*

Il tempo necessario ad entrare in fase S è diverso nelle due condizioni di ossigeno: in cellule coltivate al 20% di O<sub>2</sub> a 14 ore di stimolazione con 30 ng/ml di PDGF si nota già un aumento di cellule in fase S rispetto al controllo non stimolato, invece le cellule all'1% a 16 ore di stimolazione non mostrano ancora una percentuale di cellule in fase S significativamente maggiore rispetto al controllo.

L'ingresso delle cellule in fase S perciò è ritardato di almeno due ore, quando queste sono esposte a basse tensioni di ossigeno; la minore proliferazione quindi non è causata da un ridotto numero di cellule ciclanti, ma da un rallentamento del ciclo cellulare.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti su fibroblasti murini NIH3T3, che rappresentano un buon modello di cellule mesenchimali, ma sono una linea immortalizzata, che presenta caratteristiche in parte diverse da quelle dei fibroblasti presenti nell'organismo. Per confermare il modello sperimentale, abbiamo condotto dei test di crescita su alcune linee primarie di fibroblasti umani: fibroblasti dermici (UDEAs) e fibroblasti di prostata sono stati coltivati alle due diverse tensioni di ossigeno e le cellule sono state contate a distanza di più giorni per valutare la proliferazione cellulare (*fig.52*).

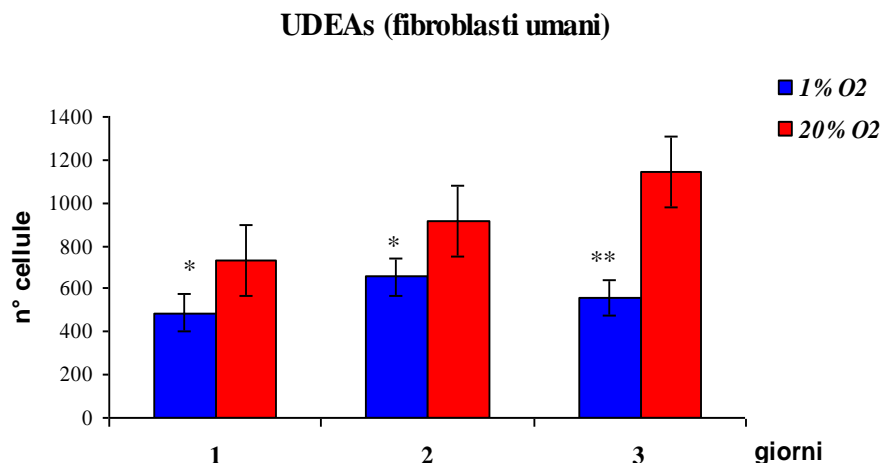


Figura 52. Proliferazione di fibroblasti dermici umani alle diverse tensioni di ossigeno: le cellule UDEAs sono state coltivate parallelamente all'1% e al 20% di ossigeno e, a distanza di 1, 2 e 3 giorni le cellule sono state osservate al microscopio e contate. Il grafico riporta la media del numero di cellule contate in 10 campi ottici. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$  rispetto al 20% O<sub>2</sub>.

La proliferazione delle cellule primarie conferma quanto visto per le NIH3T3: le cellule non trasformate coltivate all'1% di ossigeno proliferano molto meno rispetto a quelle mantenute al 20%.

### Indice di apoptosi in funzione della tensione di O<sub>2</sub>

La minor proliferazione cellulare riscontrata alle basse tensioni di ossigeno verosimilmente è causata da un blocco della mitosi, ma potrebbe essere dovuta anche ad un aumento della morte cellulare per apoptosi. Infatti molte cellule, quando si trovano in condizioni di stress, come può essere il caso di un'ipossia prolungata nel tempo, se non sono in grado di mettere in atto i meccanismi necessari a mantenere l'omeostasi cellulare, vanno incontro a morte cellulare.

Per verificare se a bassa tensione di ossigeno ci sia una maggior mortalità cellulare, abbiamo misurato il tasso di apoptosi delle NIH3T3 nelle due condizioni di ossigeno, tramite l'incorporazione di ioduro di propidio. Le cellule sono state risposese in una soluzione isotonica contenente ioduro di propidio: in questo modo le cellule restano intatte e lo ioduro di propidio entra solo in cellule apoptotiche, che presentano alterazioni della permeabilità di membrana. I campioni così ottenuti sono stati analizzati al citofluorimetro (fig.53).

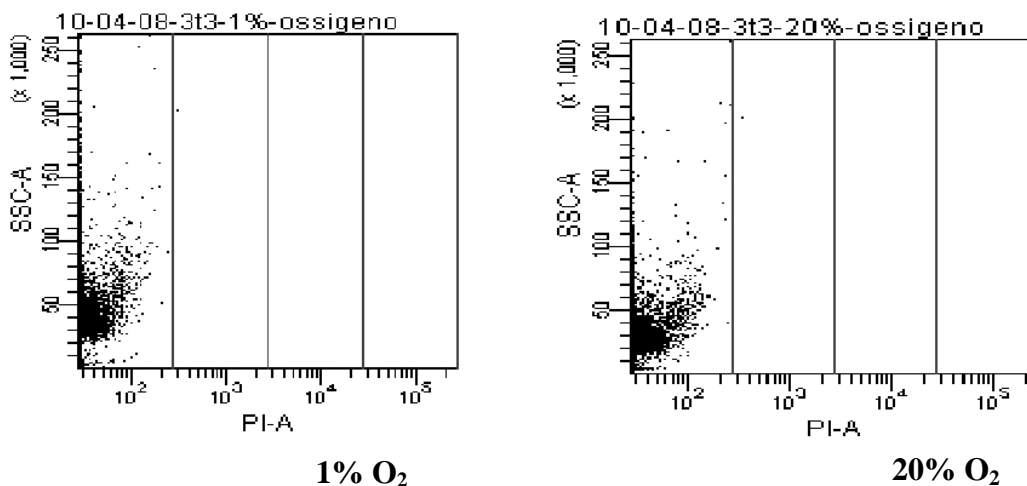


Figura 53. Tasso di apoptosi misurato con l'incorporazione dello ioduro di propidio (PI): cellule NIH3T3 sono state coltivate all'1% o al 20% di ossigeno per 3 giorni, poi sono state staccate, risospese in una soluzione isotonica contenente ioduro di propidio e analizzate al citofluorimetro. Sulle ascisse è riportata la quantità di PI incorporata, sulle ordinate il parametro SSC (side scattering), indice della morfologia cellulare.

L'incorporazione di ioduro di propidio dei due campioni è molto simile, quindi possiamo affermare che non c'è differenza nel tasso di mortalità cellulare. Questo conferma che nelle cellule non trasformate la minore proliferazione all'1% di ossigeno è dovuta realmente ad un ridotto mitosi e non ad un incremento del tasso di apoptosi.

### Migrazione ad alte e basse tensioni di O<sub>2</sub>

Come per la proliferazione, anche la migrazione cellulare nelle cellule tumorali è favorita dalla bassa tensione di ossigeno: l'ipossia infatti è stata descritta come un fattore che favorisce l'invasività e la formazione di metastasi. Anche in questo caso, l'influenza della tensione di ossigeno sulla migrazione in cellule non trasformate è poco conosciuta.

La migrazione rappresenta l'altra principale risposta cellulare dei fibroblasti, come abbiamo dimostrato nel lavoro precedente, le basse concentrazioni di PDGF (1-5 ng/ml) sono le più efficaci nello stimolare una potente risposta chemiotattica. È stato eseguito un test di *wound healing* su cellule NIH3T3 coltivate alle due diverse tensioni di ossigeno, stimolando le cellule con concentrazioni di 2, 5 o 10 ng/ml di PDGF. Dopo 17 ore dalla stimolazione, le cellule migrate nella zona centrale sono state osservate a microscopio e contate (fig54).

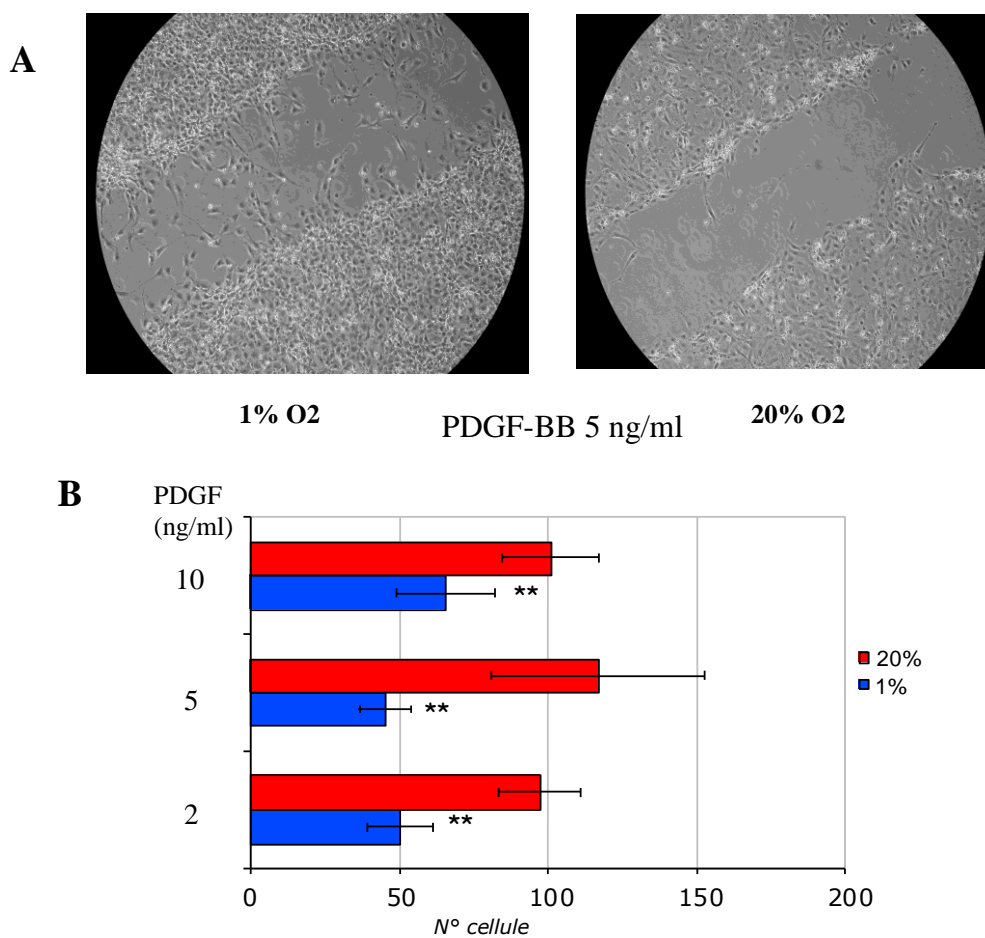


Figura 54. Test di wound healing su cellule coltivate all'1% e al 20% di ossigeno: cellule NIH3T3 sono state fatte crescere a confluenza, starvate per 24 ore, con una punta sterile è stata rimossa una striscia di cellule nella zona centrale, e sono state stimolate con 2, 5 e 10 ng/ml di PDGF. Dopo 17 ore le cellule migrate nella zona centrale sono state osservate a microscopio e contate. L'immagine rappresenta un campo ottico del test fatto con stimolazione di 5 ng/ml di PDGF; il grafico riporta la quantificazione del numero di cellule migrate, con una media calcolata su 10 campi ottici diversi. N=10, \*\* P<0,001.

In condizioni di bassa tensione di ossigeno, i fibroblasti NIH3T3 mostrano una debole risposta migratoria in risposta al PDGF-BB, rispetto a quelli coltivati al 20% di ossigeno. Le immagini al microscopio mostrano come le cellule coltivate al 20% di ossigeno abbiano una forte risposta chemiotattica alla stimolazione con PDGF, mentre le cellule all'1% migrano molto poco (*fig.54a*). La diversa capacità di migrazione alle due tensioni di ossigeno è presente per tutte le concentrazioni di PDGF utilizzate (*fig.54b*).

### **Attivazione ed espressione del PDGF-R**

Sia la proliferazione che la migrazione cellulare indotte dal PDGF nelle NIH3T3 risultano quindi molto ridotte alle basse tensioni di ossigeno. Le risposte cellulari indotte dal PDGF sono mediate dal PDGF-R, un recettore tirosino-cinasi che viene attivato per fosforilazione e media l'attivazione di diverse vie di segnalazione responsabili di risposte cellulari come proliferazione, migrazione e sopravvivenza. L'attivazione e la segnalazione di questo recettore perciò deve essere in qualche modo regolata in base alla concentrazione di ossigeno presente.

Abbiamo effettuato una tempo-dipendenza dell'attivazione del PDGF-R, su cellule cresciute in diverse condizioni di ossigeno: cellule mantenute al 20% di ossigeno, cellule coltivate all'1% per 3 giorni o per 9 giorni prima dell'esperimento.

Le cellule sono state starvate 24 ore e stimolate con concentrazioni proliferative di PDGF (30 ng/ml) per tempi diversi. I lisati sono stati analizzati mediante Western Blot e riconosciuti con anticorpi anti-P-Tyr, anti-PDGF-R e anti-actina (*fig.55*).

L'attivazione del PDGF-R al 20% di ossigeno segue l'andamento nel tempo che avevamo già visto precedentemente, con un picco di fosforilazione a 5 minuti. Nelle cellule coltivate all'1% di ossigeno questa fosforilazione è nettamente più bassa e diminuisce all'aumentare del tempo di esposizione alla bassa tensione di ossigeno. I risultati dell'esperimento dimostrano però che questa minor attivazione è in realtà causata da una ridotta espressione del PDGF-R: nelle cellule coltivate a basse tensioni di ossigeno la quantità totale di recettore è notevolmente ridotta e diminuisce all'aumentare del tempo di esposizione.

La minore responsività delle cellule coltivate all'1% rispetto al 20% di O<sub>2</sub> non è da attribuirsi quindi ad una ridotta attivazione, ma ad una minor espressione del recettore, che viene *down*-regolato in condizioni di bassa pressione di ossigeno.

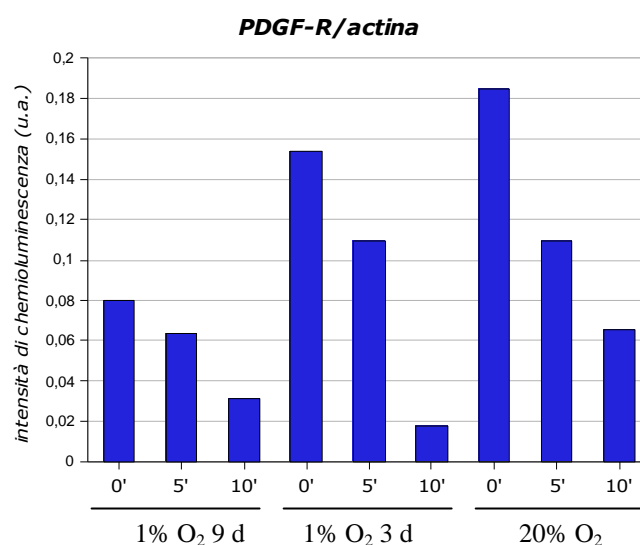
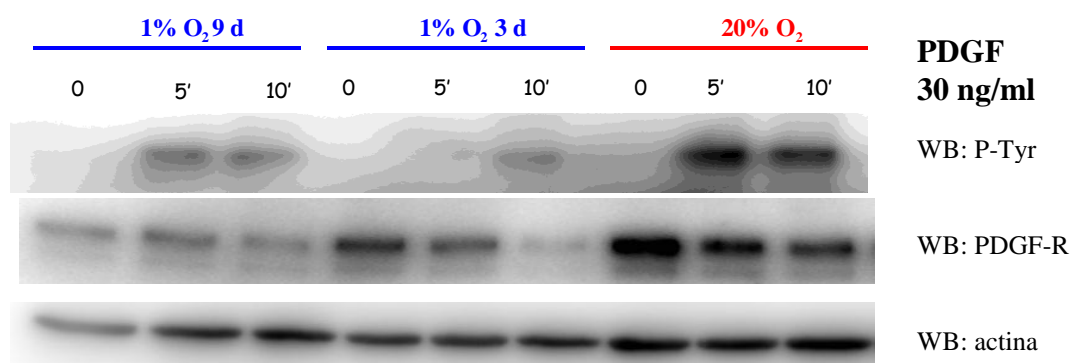


Figura 55. Fosforilazione tempo-dipendente del PDGF-R in funzione della tensione di ossigeno: cellule NIH3T3 sono state coltivate a diverse concentrazioni di ossigeno per tempi diversi (20% O<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub> per 3 giorni, 1 % O<sub>2</sub> per 9 giorni); sono state starvate 24 ore, stimolate con 30 ng/ml di PDGF-BB per 5, 10 e 20 minuti e lisate in Sample Buffer. I lisati sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-P-Tyr, anti-PDGF-R e anti-actina. L'istogramma rappresenta il rapporto fra l'intensità delle bande del PDGF-R e dell'actina. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

L'espressione di una proteina è il risultato di diversi tipi di regolazione: c'è una prima regolazione a livello trascrizionale, mediata dall'attivazione o dall'inibizione di specifici fattori di trascrizione, e una regolazione post-trascrizionale, a livello della traduzione dell'mRNA, o della degradazione della proteina.

La down-regolazione del PDGF-R alle basse tensioni di ossigeno, perciò, può essere causata da una minor trascrizione del gene, o da meccanismi di regolazione post-trascrizionale. Abbiamo effettuato una RealTime PCR su cellule coltivate nelle due condizioni di ossigeno per valutare la quantità di mRNA del gene del PDGF-R presente (fig.56).

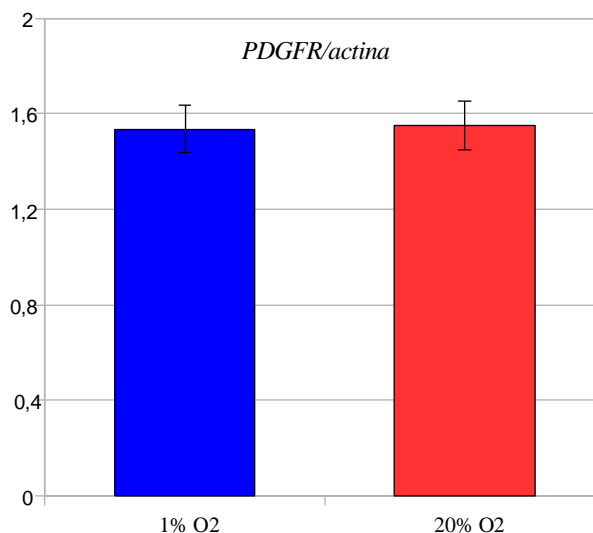


Figura 56. Quantificazione mediante RealTime PCR dell'mRNA del PDGF-R: cellule NIH3T3 sono state coltivate all'1% o al 20% di ossigeno per 3 giorni, l'RNA è stato estratto con il kit Qiagen, quindi retroscritto in c-DNA usando esameri casuali e la trascrittasi inversa MMLV. Il c-DNA è stato analizzato mediante Real-Time PCR per l'espressione del gene PDGF-R usando come house-keeping il gene per l'actina. L'istogramma rappresenta l'espressione del gene del PDGF-R normalizzato sull'actina.

Non si notano differenze significative nell'espressione del gene del PDGF-R fra i campioni coltivati all'1% e al 20% di ossigeno. La trascrizione del gene del recettore non sembra essere influenzata dalla tensione di ossigeno, quindi la ridotta espressione del recettore alle basse tensioni di ossigeno è probabilmente causata da meccanismi di regolazione post-trascrizionale.

Rimane da chiarire se questa *down*-regolazione del PDGF-R a basse tensioni di ossigeno sia un processo irreversibile, o se invece rappresenti un meccanismo di adattamento che può essere modificato in qualunque momento, ad esempio da una riesposizione ad alte concentrazioni di O<sub>2</sub>.

Per verificare la reversibilità o meno nella regolazione dell'espressione del recettore abbiamo fatto un secondo esperimento di attivazione tempo-dipendente del PDGF-R: le cellule sono state coltivate all'1% di ossigeno, poi in parte mantenute a bassa tensione di ossigeno, in parte riesposte al 20% di ossigeno per tre giorni prima della stimolazione con 30 ng/ml di PDGF (fig.57).

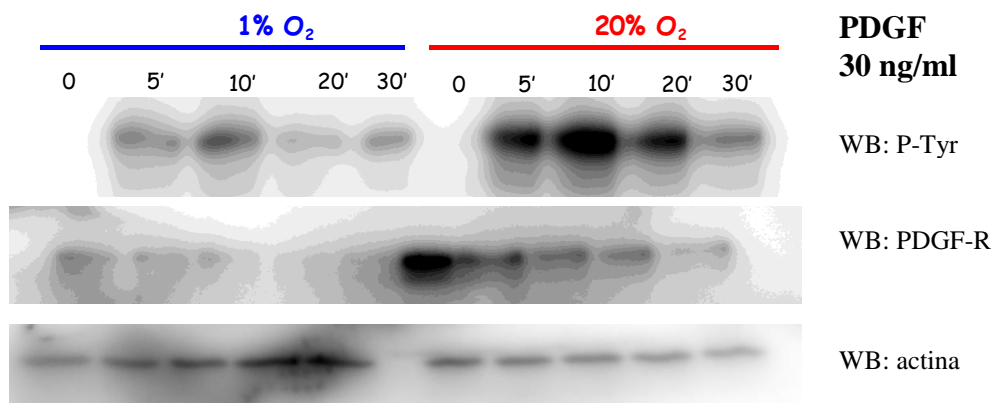


Figura 57. Reversibilità nella down-regolazione del PDGF-R a basse tensioni di ossigeno: cellule NIH3T3 sono state coltivate all'1% di ossigeno, poi in parte mantenute all'1%, in parte rieste al 20 % di O<sub>2</sub> per 3 giorni. Dopo 24 ore di starvazione, sono state stimolate con 30 ng/ml di PDGF-BB per 5, 10, 20 e 30 minuti e lisate in Sample Buffer. I lisati sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-P-Tyr, anti-PDGF-R e anti-actina. L'istogramma rappresenta il rapporto fra l'intensità delle bande del PDGF-R e dell'actina. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Le cellule coltivate all'1% di ossigeno e poi rieste ad alte concentrazioni (20% O<sub>2</sub> per tre giorni) mostrano una fosforilazione del recettore paragonabile a quella dell'esperimento precedente, in cui le cellule erano state mantenute al 20% di ossigeno per tutto il tempo. Anche in questo caso, la maggior attivazione è dovuta ad un aumento dell'espressione del recettore, in seguito alla riesposizione al 20% di ossigeno. La *down*-regolazione del PDGF-R è quindi un processo reversibile, e una riesposizione ad alte tensioni di ossigeno basta a far tornare il recettore ai livelli normali di espressione.

Da questa prima parte del lavoro possiamo concludere perciò che le basse tensioni di ossigeno causano una minor proliferazione e migrazione cellulare delle NIH3T3 in risposta al PDGF, la ragione di questa minor responsività è una ridotta espressione del PDGF-R, e questa *down*-regolazione sembra essere mediata da meccanismi di regolazione post-trascrizionali. Quindi, se per le cellule tumorali la bassa tensione di ossigeno costituisce un vantaggio selettivo in termini di migrazione e proliferazione, nelle cellule non trasformate ha la funzione di mantenere la quiescenza dei tessuti adulti. Una condizione di iperossia (20% O<sub>2</sub>) si può creare ad esempio nel caso di una ferita, e le cellule esposte a queste maggiori concentrazioni di ossigeno saranno stimolate a migrare e proliferare maggiormente per ricostruire il tessuto danneggiato.

### **Il ruolo di HIF-1 $\alpha$**

Le risposte indotte dalle basse tensioni di ossigeno sono mediate principalmente dal fattore di trascrizione indotto dall'ipossia. HIF è un fattore di trascrizione dimerico, costituito da una subunità costitutiva  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ) e da una subunità inducibile  $\alpha$ , che esiste in tre diverse isoforme (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ), fra queste la più conosciuta e meglio caratterizzata è la subunità HIF-1 $\alpha$ . Ad alte concentrazioni di ossigeno, la subunità  $\alpha$  viene idrossilata da specifici enzimi, la proteina pVHL si lega alla subunità idrossilata e la indirizza alla degradazione. A basse tensioni di ossigeno, invece, le PHD sono inattive, la subunità  $\alpha$  non viene modificata e rimane stabile, migra nel nucleo dove si lega alla subunità  $\beta$  e attiva la trascrizione. Ci sono molti livelli di modulazione dell'attività di HIF, ad esempio altre modifiche post-traduzionali, che regolano la stabilità di HIF o l'interazione con i cofattori necessari all'attività trascrizionale. Inoltre sembra che HIF possa essere attivato anche da stimoli diversi dall'ipossia e che sia possibile una sua stabilizzazione ad alte concentrazioni di ossigeno (Chandel NS et al., 1998; Duyndam MC et al., 2001).

Moltissimi lavori dimostrano come HIF sia un fattore che promuove la progressione tumorale, infatti favorisce la proliferazione, l'invasività e la formazione di metastasi. Molti tumori presentano un'overespressione di HIF-1 $\alpha$ , che spesso è associata ad una maggiore aggressività del tumore.

Per studiare il ruolo di questo fattore di trascrizione nel nostro modello sperimentale, abbiamo silenziato l'espressione di HIF-1 $\alpha$  nelle NIH3T3, utilizzando siRNA specifici; per verificare l'espressione della proteina è stata condotta una RealTime PCR. A tre giorni dalla trasfezione abbiamo ottenuto un buon silenziamento della proteina in entrambe le condizioni: all'1% di ossigeno si ha una riduzione dell'espressione di circa il 70%, al 20% di ossigeno una riduzione del 50% (*fig.58*).

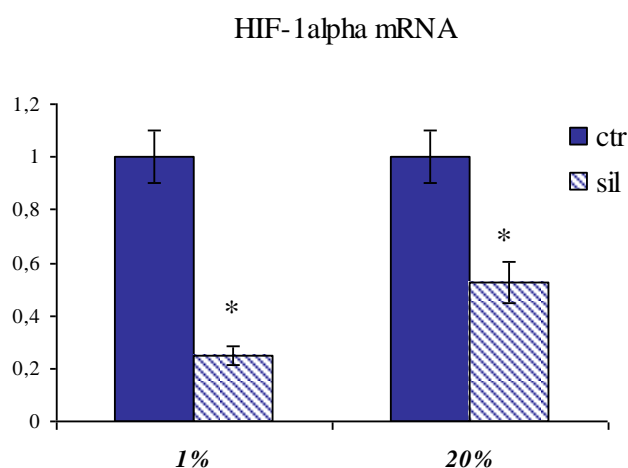


Figura 58. Silenziamento di HIF-1 $\alpha$ : le cellule NIH3T3 sono state coltivate parallelamente all'1% e al 20%, raggiunta una confluenza del 50-60% sono state trasfettate con i siRNA, dopo tre giorni è stato estratto l'RNA con il kit Qiagen, quindi retrotrascritto in c-DNA usando esameri casuali e la trascrittasi inversa MMLV. Il c-DNA è stato analizzato mediante Real-Time PCR per l'espressione del gene HIF-1 $\alpha$  usando come house-keeping il gene per l'actina. L'istogramma rappresenta l'espressione del gene di HIF-1 $\alpha$  normalizzato sull'actina. \* $P < 0,01$ .

Abbiamo effettuato dei test di crescita utilizzando la marcatura con CFSE su cellule di controllo e su cellule silenziate, per valutare il ruolo di HIF-1 $\alpha$  nella regolazione della proliferazione cellulare a basse e alte tensioni di ossigeno. Cellule NIH3T3, coltivate all'1% e al 20% di ossigeno, sono state trasfettate con i siRNA per HIF-1 $\alpha$ , e stimolate con PDGF o con siero al 10% (fig.59).

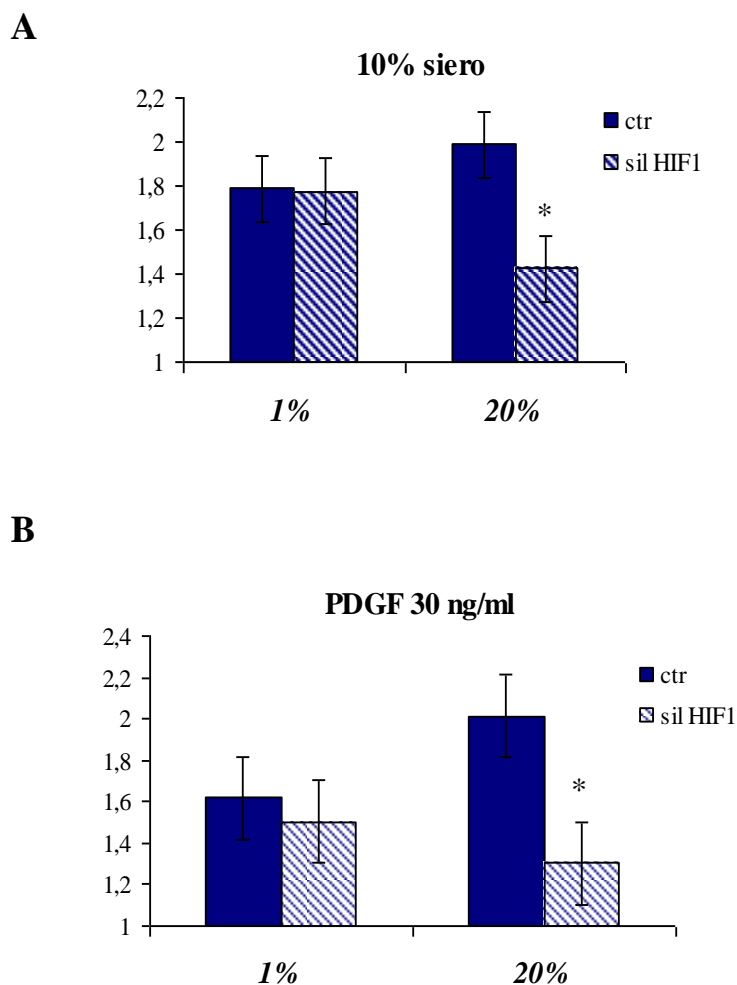


Figura 59. Test di crescita in cellule silenziate per HIF-1 $\alpha$ : le cellule sono state coltivate parallelamente all'1% e al 20% di O<sub>2</sub>, alcune di esse sono state trasfettate con i siRNA per HIF-1 $\alpha$ , quindi sono state starvate 24 ore prima della stimolazione con siero al 10% (A) o con 30 ng/ml di PDGF (B). Le cellule sono state marcate con la sonda fluorescente CFSE prima di essere stimolate, 24 ore dopo la stimolazione sono state staccate, fissate in paraformaldeide al 3% e analizzate al citofluorimetro. In grafico è riportato l'indice di proliferazione calcolato su una media di 5 esperimenti, \*  $P < 0,01$ .

Nelle cellule all'1% di ossigeno non si evidenziano differenze significative nella crescita fra cellule di controllo e cellule silenziate per HIF-1 $\alpha$ , sia nella stimolazione con siero, sia con PDGF. Nelle cellule al 20% di ossigeno, invece, il silenziamento di HIF-1 $\alpha$  provoca una drastica riduzione della proliferazione cellulare, in entrambe le condizioni di stimolazione. HIF-1 $\alpha$  perciò non è il responsabile della ridotta proliferazione cellulare delle NIH3T3 in condizioni di bassa tensione di ossigeno, al contrario, sembra avere un ruolo pro-proliferativo al 20% di ossigeno, in quanto la

sua assenza causa una riduzione della proliferazione cellulare. Quindi, come descritto per le cellule tumorali, questo fattore di trascrizione mantiene una funzione mitogenica anche per le cellule non trasformate, che risulta evidente in condizioni di forte proliferazione, come al 20% di ossigeno, ed è probabilmente poco visibile in condizioni in cui le cellule proliferano meno, come all'1% di ossigeno.

L'influenza di HIF-1 $\alpha$  sulla crescita cellulare ad alte concentrazioni di ossigeno contraddice quanto descritto generalmente sulla scarsa stabilità di HIF a queste condizioni. Questo fenomeno potrebbe essere spiegato da dati presenti in letteratura sulla regolazione di HIF-1 $\alpha$  da parte dei fattori di crescita e sulla sua stabilizzazione ad alte tensioni di ossigeno ad opera dei ROS. La stimolazione con PDGF o con altri fattori di crescita presenti nel siero potrebbe regolare l'attività di HIF, attivando la sua espressione o aumentandone l'attività trascrizionale mediante fosforilazione. Inoltre le vie di segnalazione attivate dai fattori di crescita provocano un aumento dei ROS, che sembrano stabilizzare HIF-1 $\alpha$  in normossia.

Le cellule silenziate per HIF-1 $\alpha$  sono state utilizzate anche per fare una tempo-dipendenza dell'attivazione del PDGF-R. Le cellule silenziate e di controllo sono state stimolate con 30 ng/ml di PDGF per tempi diversi e i lisati sono stati analizzati per valutare l'attivazione del recettore e della via delle MAPK (*fig.60*).

Nei lisati all'1% di ossigeno non si riscontrano differenze evidenti fra i controlli e le cellule silenziate per HIF-1 $\alpha$ : la fosforilazione del recettore e quella delle ERK 1 e 2 sono sovrapponibili, simili sia come andamento nel tempo che come intensità. Al 20% di ossigeno invece, soprattutto per quanto riguarda il PDGF-R, c'è una netta diminuzione della fosforilazione nelle cellule silenziate per HIF-1 $\alpha$ . L'attivazione tempo-dipendente del PDGF-R conferma quanto visto precedentemente con il test di crescita: all'1% di ossigeno il silenziamento di HIF-1 $\alpha$  non influenza la risposta cellulare, mentre al 20% di ossigeno causa una riduzione dell'attivazione del PDGF-R e quindi delle risposte da esso attivate.

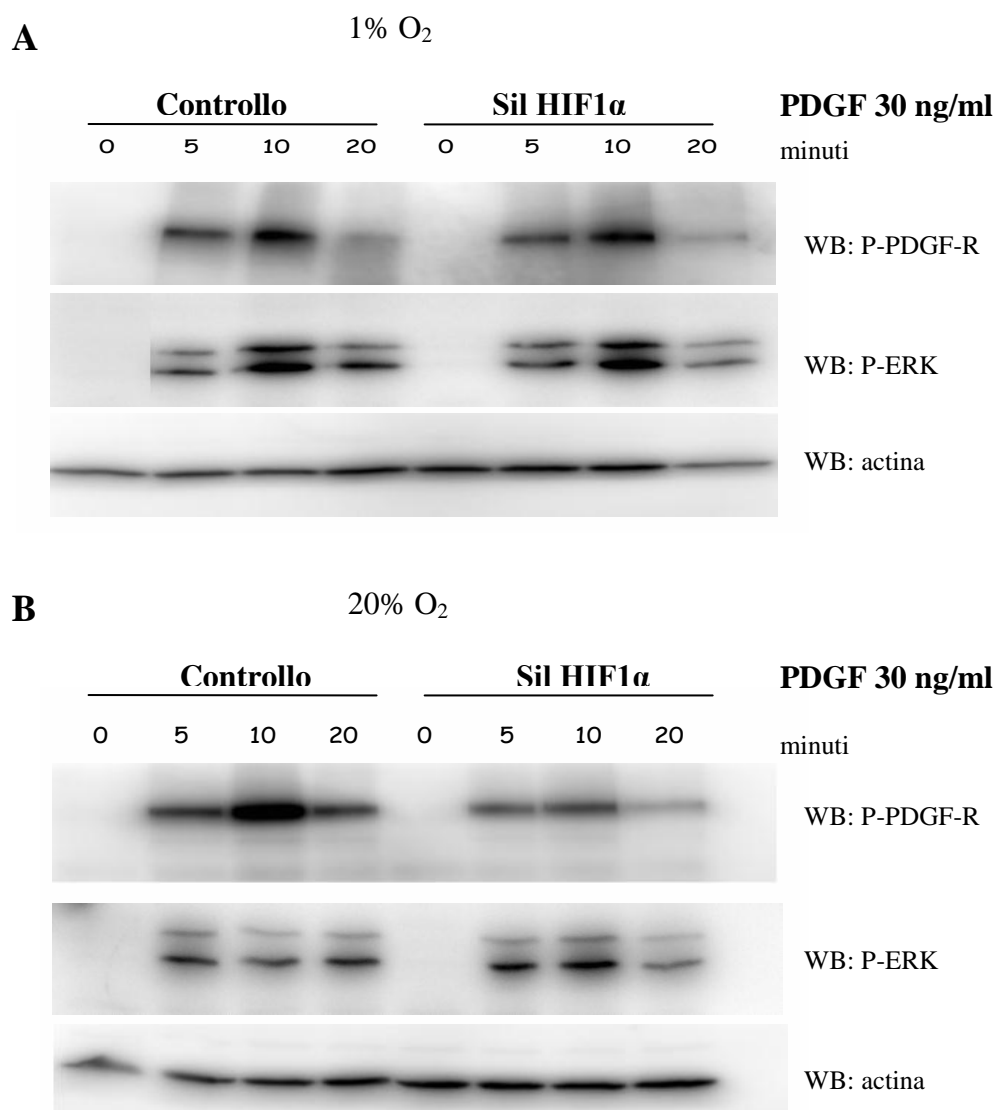


Figura 60. Fosforilazione del PDGF-R e delle ERK 1 e 2 in cellule silenziate per HIF-1 $\alpha$ : cellule NIH3T3, coltivate parallelamente all'1% (A) e al 20% di ossigeno (B), sono state trasfettate con siRNA per HIF-1 $\alpha$  tre giorni prima dell'esperimento; dopo 24 ore di starvazione, le cellule sono state stimolate con 30 ng/ml di PDGF e lisate in Sample Buffer dopo 5, 10 e 20 minuti. I lisati sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi anti-P-Tyr, anti-P-Erk e normalizzate con anticorpi anti-actina. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

### **Il ruolo di HIF-2 $\alpha$**

La prima isoforma di HIF ad essere scoperta fu la HIF-1 $\alpha$ , non sorprende perciò che questa sia anche la più conosciuta e studiata. In seguito sono state scoperte altre due isoforme, la HIF-2 $\alpha$  e la HIF-3 $\alpha$ , queste non sono ubiquitarie come HIF-1 $\alpha$ , ma negli ultimi anni è stata dimostrata la loro presenza in un gran numero di tessuti. Queste due isoforme sono ancora poco conosciute, ma recentemente sta acquistando attenzione soprattutto l'isoforma HIF-2 $\alpha$ . In particolare è emerso che, nonostante HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  siano molto simili come struttura, attività e regolazione, hanno funzioni non ridondanti, come dimostra il fatto che la delezione di una o dell'altra isoforma produca fenotipi diversi, e che esse svolgano funzioni diverse nello sviluppo embrionale.

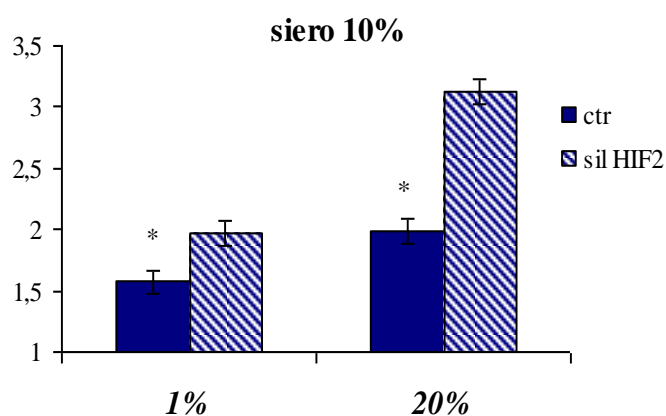
Per studiare il ruolo di questa isoforma di HIF nelle risposte indotte dalla bassa tensione di ossigeno in cellule non trasformate, abbiamo fatto una nuova trasfezione, silenziando l'espressione di HIF-2 $\alpha$  con specifici siRNA.

Su cellule silenziate per HIF-2 $\alpha$  sono stati condotti test di crescita, usando la marcatura con CFSE e stimolando con siero o con PDGF 30 ng/ml (*fig.61*).

Il silenziamento di HIF-2 $\alpha$  causa un incremento evidente della crescita cellulare nelle cellule coltivate all'1% di ossigeno, sia nel caso della stimolazione con siero sia con PDGF. Al 20% di ossigeno l'effetto è meno marcato, ma si ha comunque un aumento della crescita cellulare per le cellule in cui HIF-2 $\alpha$  è silenziato, evidente soprattutto nelle stimolazione con siero.

HIF-2 $\alpha$  quindi si comporta da inibitore della crescita cellulare e sembra essere il responsabile della ridotta proliferazione delle NIH3T3 a basse tensioni di ossigeno.

**A**



**B**

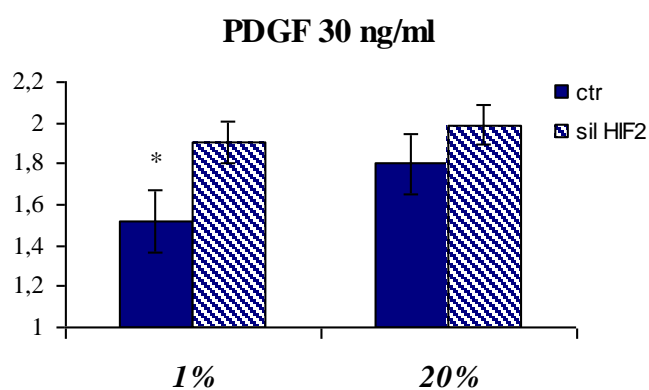


Figura 61. Test di crescita in cellule silenziate per HIF-2 $\alpha$ : cellule coltivate all'1% o al 20% di O<sub>2</sub>, sono state trasfettate con i siRNA per HIF-2 $\alpha$ , quindi starvate 24 ore prima della stimolazione con siero al 10% (A) o con 30 ng/ml di PDGF (B). Le cellule sono state marcate con la sonda fluorescente CFSE e trattate come descritto precedentemente. In grafico è riportato l'indice di proliferazione calcolato su una media di 5 esperimenti, \* P<0,01.

Su cellule silenziate per HIF-2 $\alpha$  è stata analizzata anche la migrazione cellulare mediante un test di *wound healing* (fig.62). Anche in questo caso, le cellule silenziate per HIF-2 $\alpha$  mostrano una capacità di migrazione ridotta rispetto ai controlli, sia all'1% che al 20% di ossigeno. Il test di migrazione conferma quindi il ruolo essenziale di HIF-2 $\alpha$  nel mediare le risposte cellulari dei fibroblasti NIH3T3.

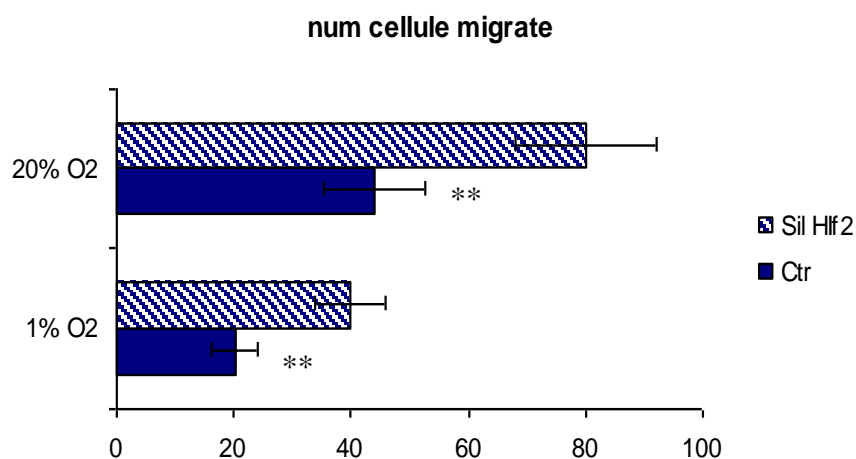


Figura 62: Test di wound healing in cellule silenziate per HIF-2 $\alpha$ : cellule coltivate all'1% o al 20% di O<sub>2</sub>, sono state trasfettate con i siRNA per HIF-2 $\alpha$  e lasciate crescere a confluenza; sono state starvate 24 ore, dopodich  è stata rimossa una striscia di cellule nella zona centrale e sono state stimolate con 5 ng/ml di PDGF. Dopo 17 ore le cellule sono state osservate al microscopio, il grafico riporta la quantificazione della migrazione cellulare calcolata su 10 campi ottici diversi. N=10, \*\* P<0,001.

HIF-2 $\alpha$  si comporta in maniera opposta rispetto a HIF-1 $\alpha$ , rallentando sia la proliferazione che la migrazione cellulare indotta da PDGF. Possiamo affermare perci  che il fattore HIF-1 $\alpha$  abbia azione pro-proliferativa, mentre HIF-2 $\alpha$  costituisce un fattore che inibisce la crescita cellulare.

La regolazione della proliferazione cellulare da parte dei due fattori di trascrizione cambia in base alla concentrazione di ossigeno: l'effetto di HIF-1 $\alpha$  di aumento della crescita cellulare prevale ad alte tensioni di ossigeno, mentre HIF-2 $\alpha$  esercita i suoi effetti di inibizione della crescita soprattutto a basse tensioni di ossigeno.

È noto come al 20% di ossigeno HIF-1 $\alpha$  sia poco stabile ed abbia un'emivita molto breve, ma i nostri risultati indicano chiaramente che anche in tali condizioni l'attivit  di questo fattore di trascrizione non   nulla, ma comunque sufficiente a spiegare il suo effetto pro-proliferativo. A basse tensioni di ossigeno, entra in gioco anche HIF-2 $\alpha$ , il cui effetto di inibizione della crescita prevale sull'effetto mitogenico di HIF-1 $\alpha$ . I due fattori di trascrizione perci  hanno funzioni non sovrapponibili fra loro e la risposta cellulare evocata sar  un risultato dell'equilibrio fra i due fattori, che varia in base alla tensione di ossigeno presente.

## DISCUSSIONE

Nella bibliografia corrente è considerata “normossia” una tensione parziale di ossigeno di 20 kPa, pari a circa il 20% della pressione atmosferica; in realtà, la concentrazione di ossigeno fisiologica è molto variabile nei diversi tipi cellulari ed è ben diversa da quella atmosferica. Negli alveoli polmonari si trova una pressione di ossigeno intorno a valori del 13% e a livello dei capillari periferici è circa dell’8%; nei tessuti, allontanandosi dal vaso sanguigno, la percentuale di ossigeno decresce rapidamente secondo il quadrato della distanza, e tende a valori intorno al 2%. Ipoteticamente circa il 90% delle cellule di un tessuto perciò si trova esposto a concentrazioni di ossigeno inferiori al 3%. Nel nostro modello sperimentale abbiamo considerato valori dall’1 al 3% di ossigeno come condizioni fisiologiche di normossia per fibroblasti murini NIH3T3, mentre un’alta tensione di ossigeno (20%) rappresenta una condizione di iperossia, che si può venire a creare in situazioni particolari, come il caso di una ferita, in cui il tessuto viene esposto all’ambiente esterno e si crea un gradiente nella tensione di ossigeno.

Abbiamo dimostrato che cellule non trasformate (per esempio i fibroblasti murini) si dimostrano essenzialmente quiescenti a basse tensioni di ossigeno. Infatti la proliferazione delle NIH3T3 all’1% di O<sub>2</sub> è nettamente minore delle cellule mantenute al 20%, sia in risposta al siero che alla stimolazione con PDGF-BB (30 ng/ml), e la risposta chemiotattica indotta nei fibroblasti da basse concentrazioni di PDGF è notevolmente ridotta. Questo dato è stato confermato in linee primarie di fibroblasti dermici umani (UDEAs), che mostrano anch’esse una crescita cellulare significativamente ridotta quando sono esposte all’1% di ossigeno. La bassa tensione di ossigeno induce nelle NIH3T3 un rallentamento del ciclo cellulare di almeno 2 ore, senza causare un aumento di morte cellulare per apoptosi. Per le cellule non trasformate quindi la condizione di bassa tensione di ossigeno non rappresenta una situazione anomala o patologica di “ipossia”, ma una condizione molto simile a quella percepita dalle cellule nell’organismo, che favorisce la quiescenza e la stasi cellulare.

Invece nelle cellule tumorali, come quelle di melanoma che abbiamo analizzato, derivanti da tumore primario (A375) o da metastasi (Hs29), la bassa tensione di ossigeno favorisce la proliferazione cellulare.

L'indagine che abbiamo condotto sulla risposta proliferativa indotta dal PDGF ha dimostrato che la minor responsività delle cellule alla stimolazione mitogenica con PDGF è causata da una *down*-regolazione del recettore. L'espressione del PDGF-R diminuisce all'aumentare del tempo di esposizione a basse tensioni di ossigeno, non a causa di una regolazione sulla trascrizione del gene, ma secondo un meccanismo di regolazione post-trascrizionale, ancora non determinato. La *down*-regolazione del recettore rappresenta un meccanismo di adattamento reversibile, infatti una riesposizione delle cellule al 20% di ossigeno fa tornare il PDGF-R a livelli di espressione normali.

Le cellule non trasformate, che sono normalmente esposte a basse tensioni di ossigeno, mostrano quindi una bassa responsività ai fattori di crescita, a differenza di quanto succede per le cellule tumorali. Se per le cellule tumorali la bassa tensione di ossigeno costituisce un vantaggio selettivo in termini di migrazione e proliferazione, nelle cellule non trasformate questa rappresenta invece una condizione di "normalità" e ha la funzione di mantenere la quiescenza dei tessuti adulti. Finché le cellule rimangono esposte a basse tensioni di ossigeno manterranno una bassa propensione alla proliferazione e alla migrazione cellulare; una condizione di iperossia (20% O<sub>2</sub>), che si può venire a creare ad esempio nel caso di una ferita o di uno stato di infiammazione, evocherà nei fibroblasti un'intensa risposta di proliferazione e migrazione, con lo scopo di ricostruire il tessuto danneggiato.

Le risposte indotte dalle basse tensioni di ossigeno sono mediate principalmente dal fattore di trascrizione indotto dall'ipossia. HIF è un fattore di trascrizione dimerico, costituito da una subunità costitutiva  $\beta$  e da una subunità inducibile  $\alpha$ , che esiste in tre diverse isoforme, la più conosciuta e studiata è la HIF-1 $\alpha$ , le altre sono la HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$ . Molti tumori presentano un'overespressione di HIF, che sembra favorire la progressione tumorale, promuovendo la proliferazione, l'invasività e la formazione di metastasi.

Nel nostro modello sperimentale, HIF-1 $\alpha$  non è il responsabile della minore proliferazione delle NIH3T3 a basse tensioni di ossigeno, anzi, sembra avere un ruolo pro-proliferativo, soprattutto ad alte tensioni di ossigeno. Infatti il silenziamento di HIF-1 $\alpha$  non altera il fenotipo delle NIH3T3 a bassa tensione di ossigeno, mentre, ad alte tensioni di ossigeno le cellule silenziate per HIF-1 $\alpha$  proliferano meno rispetto al controllo e il PDGF-R risulta meno attivato in risposta al PDGF.

Secondo i nostri risultati, il responsabile della minore responsività cellulare a basse tensioni di ossigeno sembra essere HIF-2 $\alpha$ . Il silenziamento di HIF-2 $\alpha$  infatti altera notevolmente il fenotipo cellulare a basse tensioni di ossigeno: le cellule silenziate proliferano nettamente di più rispetto ai controlli e migrano anche in misura maggiore. Anche al 20% di O<sub>2</sub>, sebbene meno evidente, il silenziamento di HIF-2 $\alpha$  ha l'effetto di incrementare le risposte cellulari di proliferazione e migrazione cellulare.

Nonostante ad alte tensioni di ossigeno HIF sia poco stabile, la sua attività non è nulla e svolge importanti funzioni nella regolazione delle risposte cellulari. Quello che possiamo ipotizzare è che ad alte tensioni di ossigeno l'attività minima di HIF-1 $\alpha$  sia responsabile della maggior proliferazione cellulare delle NIH3T3, mentre al diminuire della tensione di ossigeno prevalga l'effetto frenante di HIF-2 $\alpha$ , causando una minore migrazione e proliferazione cellulare. HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  quindi sembrano avere un ruolo opposto nella regolazione della proliferazione cellulare: HIF-1 $\alpha$ , come descritto per le cellule tumorali, funziona da fattore stimolante la mitosi, mentre HIF-2 $\alpha$  inibisce la proliferazione e la migrazione cellulare.

È stato descritto un coinvolgimento di HIF-1 $\alpha$ , ma anche di HIF-2 $\alpha$ , nella progressione neoplastica, infatti entrambi sembrano favorire la proliferazione delle cellule tumorali. In una cellula tumorale la fisiologia cellulare risulta profondamente alterata, la disregolazione del metabolismo e dei meccanismi di controllo dell'apoptosi e del ciclo cellulare possono render conto di fenotipi molto diversi da quelli di una cellula sana. La funzione pro-proliferativa di HIF-2 $\alpha$ , riportata da alcuni autori, in questo contesto può quindi essere dovuta ad alterazioni della sua attività, o al prevalere dell'attività di altre proteine, che nascondono l'effetto di inibizione della crescita, proprio di HIF-2 $\alpha$ .

## BIBLIOGRAFIA

- Aase K, Abramsson A, Karlsson L, Betsholtz C, Eriksson U “Expression analysis of PDGF-C in adult and developing mouse tissues”. *Mech Dev.*, 2002 Jan;110(1-2):187-91.
- Abboud HE “Role of platelet-derived growth factor in renal injury”. *Annu Rev Physiol*, 1995; 57:297-309.
- An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. *Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha*. *Nature*. 1998 Mar 26;392(6674):405-8.
- Anand-Apte B, Zetter BR, Viswanathan A, Qiu RG, Chen J, Ruggieri R, Symons M “Platelet-derived growth factor and fibronectin-stimulated migration are differentially regulated by the Rac and extracellular signal-regulated kinase pathways”. *J Biol Chem*, 1997 Dec 5; 272(49):30688-92.
- Andersson M, Ostman A, Kreysing J, Backstrom G, Van De Poll M, Heldin CH “Involvement of loop 2 of platelet-derived growth factor-AA and -BB in receptor binding”. *Growth Factors*, 1995; 12(2):159-64.
- Ansel JC, Tiesman JP, Olerud JE, Krueger JG, Krane JF, Tara DC, Shipley GD, Gilbertson D, Usui ML, Hart CE “Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor”. *J Clin Invest*, 1993 Aug;92(2):671-8.
- Antoniadis HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M, Selman M “Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis”. *J Clin Invest*. 1990 Oct; 86(4):1055-64.
- Antoniadis HN, Scher CD, Stiles CD “Purification of human platelet-derived growth factor”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979 Apr; 76(4):1809-13.
- Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM. *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.
- Aslanian A, Iaquinta PJ, Verona R, Lees JA. *Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics*. *Genes Dev*. 2004 Jun 15;18(12):1413-22.
- Ataliotis P, Mercola M “Distribution and functions of platelet-derived growth factors and their receptors during embryogenesis”. *Int. Rev. Cytol*. 1997; 172:95-127.
- Bacon AL, Fox S, Turley H, Harris AL. *Selective silencing of the hypoxia-inducible factor 1 target gene BNIP3 by histone deacetylation and methylation in colorectal cancer*. *Oncogene*. 2007 Jan 4;26(1):132-41.
- Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A, Rhee SG “Platelet-derived growth factor-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase”. *J Biol Chem*, 2000 Apr 7; 275(14):10527-31.
- Bar RS, Boes M, Booth BA, Dake BL, Henley S, Hart MN “The effects of platelet-derived growth factor in cultured microvessel endothelial cells”. *Endocrinology*, 1989 Apr;124(4):1841-8.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC “Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage”. *Cell*, 1992 Jul 10;70(1):31-46.
- Bar-Sagi D, Feramisco JR “Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins” *Science*, 1986 Sep 5; 233(4768):1061-8.
- Beckmann MP, Betsholtz C, Heldin CH, Westermarck B, Di Marco E, Di Fiore PP, Robbins KC, Aaronson SA “Comparison of biological properties and transforming potential of human PDGF-A and PDGF-B chains”. *Science*, 1988 Sep 9; 241(4871):1346-9.
- Beitz JG, Kim IS, Calabresi P, Frackelton AR Jr “Human microvascular endothelial cells express receptors for platelet-derived growth factor”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991 Mar 1; 88(5):2021-5.
- Bejcek BE, Li DY, Deuel TF “Transformation by v-sis occurs by an internal autoactivation mechanism”. *Science*, 1989 Sep 29; 245(4925):1496-9.
- Bennin DA, Don AS, Brake T, McKenzie JL, Rosenbaum H, Ortiz L, DePaoli-Roach AA, Horne MC. *Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest*. *J Biol Chem*. 2002 Jul 26;277(30):27449-67.
- Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A. *Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation*. *Circ Res*. 2002 Apr 19;90(7):784-91.

- Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR. *Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain*. Eur J Neurosci. 1999 Dec;11(12):4159-70.
- Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH, Alitalo K, Eriksson U "PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor". Nat. Cell. Biol., 2001 May;3(5):512-6.
- Berk BC, Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA Jr, Webb RC "Vasoconstriction: a new activity for platelet-derived growth factor". Science, 1986 Apr 4;232(4746):87-90.
- Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. *HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia*. EMBO J. 2003 Aug 15;22(16):4082-90.
- 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 Jul;2(7):615-20.
- Berridge MJ "Inositol triphosphate and calcium signalling". Nature, 1993 Jan 28; 361(6410):315-25.
- Betsholtz C, Johnsson A, Heldin CH, Westermark B, Lind P, Ureda S, Eddy R, Shows TB, Philpott K, Mellor AL, Knott TJ, Scott J "cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines". Nature, 1986 Apr 24-30; 320(6064):695-9.
- Betsholtz C, Westermark B, Ek B, Heldin CH "Coexpression of a PDGF-like growth factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line: implications for autocrine receptor activation". Cell, 1984 Dec; 39(3 Pt 2):447-57.
- Bianchi L, Tacchini L, Cairo G. *HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation*. Nucleic Acids Res. 1999 Nov 1;27(21):4223-7.
- Billett MA, Adbeish IS, Alrokayan SA, Bennett AJ, Marenah CB, White DA "Increased expression of genes for platelet-derived growth factor in circulating mononuclear cells of hypercholesterolemic patients". Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996 Mar; 16(3):399-406.
- Bishayee S, Majumdar S, Khire J, Das M "Ligand-induced dimerization of platelet-derived growth factor receptor. Monomer-dimer interconversion occurs independent of receptor phosphorylation". J Biol Chem, 1989 Jul 15;264(20):11699-705.
- Bjarnegard M, Enge M, Norlin J, Gustafsdottir SM, Fredriksson S, Abramson A, Takemoto M, Gustafsson E, Fassler R, Betsholtz C "Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities". Development, 2004; 131:1847-57.
- Blais JD, Addison CL, Edge R, Falls T, Zhao H, Wary K, Koumenis C, Harding HP, Ron D, Holcik M, Bell JC. *Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress*. Mol Cell Biol. 2006 Dec;26(24):9517-32.
- Blatti SP, Foster DN, Ranganathan G, Moses HL, Getz MJ "Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells". Proc Natl Acad Sci U S A, 1988 Feb;85(4):1119-23.
- Blume-Jensen P, Hunter T "Oncogenic kinase signalling". Nature, 2001 May 17; 411(6835):355-65.
- Bokoch GM, Wang Y, Bohl BP, Sells MA, Quilliam LA, Knaus UG "Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1)". J Biol Chem, 1996 Oct 18; 271(42):25746-9.
- Booker GW, Breeze AL, Downing AK, Panayotou G, Gout I, Waterfield MD, Campbell ID "Structure of an SH2 domain of the p85 alpha-subunit of phosphatidylinositol-3-OH-kinase". Nature, 1992 Aug 20; 358(6388):684-7.
- Bornfeldt KE, Campbell JS, Koyama H, Argast GM, Leslie CC, Raines EW, Krebs EG, Ross R "The mitogen-activated protein kinase pathway can mediate growth inhibition and proliferation in smooth muscle cells. Dependence on the availability of downstream targets". J Clin Invest, 1997 Aug 15; 100(4):875-85.
- Bostrom H, Willets K, Pekny M, Leveen P, Lindahl P, Henstrand H, Pekna M, Hellstrom M, Gebre-Medin S, Schalling M, Nilsson M, Kurland S, Tornell J, Health JK, Betsholtz C "PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis". Cell, 1996; 85:863-73.
- Brahim-Horn MC, Pouyssegur J. *Hypoxia in cancer cell metabolism and pH regulation*. Essays Biochem. 2007;43:165-78.
- Brand KA, Hermfisse U. *Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species*. FASEB J. 1997 Apr;11(5):388-95.

- Bruick RK, McKnight SL. *A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF*. Science. 2001 Nov 9;294(5545):1337-40.
- Bruick RK. *Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Aug 1;97(16):9082-7.
- Bryckaert MC, Rendu F, Tobelem G, Wasteson A “Collagen-induced binding to human platelets of platelet-derived growth factor leading to inhibition of P43 and P20 phosphorylation”. J Biol Chem, 1989 Mar 15;264(8):4336-41.
- Burke CL, Lemmon MA, Coren BA, Engelman DM, Stern DF “Dimerization of the p185(neu) transmembrane domain is necessary but not sufficient for transformation”. Oncogene, 1997 Feb 13; 14(6):687-96.
- Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleagle JM, Ragoussis J. *hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer*. Clin Cancer Res. 2008 Mar 1;14(5):1340-8.
- Canalis E. “Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria”. Metabolism, 1981 Oct;30(10):970-5.
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis*. Nature. 1998 Jul 30;394(6692):485-90.
- Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L. *Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha*. Mol Cell Biol. 2000 Jan;20(1):402-15.
- Carroll M, Tomasson MH, Barker GF, Golub TR, Gilliland DG “The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways”. Proc Natl Acad Sci USA, 1996 Dec 10; 93(25):14845-50.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Sep 29;95(20):11715-20.
- Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. *Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia*. J Biol Chem. 2001 Mar 23;276(12):9519-25.
- Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ET. *SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia*. Cell. 2007 Nov 2;131(3):584-95.
- Chiarugi P, Cirri P, Marra F, Raugei G, Fiaschi T, Camici G, Manao G, Romanelli RG, Ramponi G “The Src and signal transducers and activators of transcription pathways as specific targets for low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase in platelet-derived growth factor signaling”. J Biol Chem, 1998 Mar 20; 273(12):6776-85.
- Chiarugi P, Cirri P, Taddei ML, Talini D, Doria L, Fiaschi T, Buricchi F, Giannoni E, Camici G, Raugei G, Ramponi G “New perspectives in PDGF receptor downregulation: the main role of phosphotyrosine phosphatases”. J Cell Sci. 2002 May 15; 115(Pt 10):2219-32.
- Claesson-Welsh LA, Eriksson B, Westermarck B, Heldin CH “cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structure similarity to the B-type PDGF receptor”. Proc Natl Acad Sci USA, 1989 Jul; 86(13):4917-21.
- Clarke MF, Westin E, Schmidt D, Josephs SF, Ratner L, Wong-Staal F, Gallo RC, Reitz MS Jr “Transformation of NIH 3T3 cells by a human c-sis cDNA clone”. Nature, 1984 Mar 29-Apr 4; 308(5958):464-7.
- Clements JM, Bawden LJ, Bloxidge RE, Catlin G, Cook AL, Craig S, Drummond AH, Edwards RM, Fallon A, Green DR, Hellewell PG, Kirwin PM, Nayee PD, Richardson SJ, Brown D, Chahwala SB, Snarey M, Winslow D “Two PDGF-BB chain residues, arginine 27 and isoleucine 30, mediate receptor binding and activation”. EMBO, 1991 Dec; 10(13):4113-20.
- Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. *Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*. J Biol Chem. 2000 Aug 18;275(33):25733-41.
- Compornolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, Van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P. *Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice*. Nat Med. 2002 Jul;8(7):702-10.
- Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, Kutok J, Clark J, Galinsky I, Griffin JD, Cross NC, Tefferi A, Malone J, Alam R, Schrier SL, Schmid J, Rose M,

- Vandenberghe P, Verhoef G, Boogaerts M, Wlodarska I, Kantarjian H, Marynen P, Coutre SE, Stone R, Gilliland DG "A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome". *N Engl J Med*, 2003 Mar 27; 348(13):1201-14.
- Cunningham LD, Brecher P, Cohen RA "Platelet-derived growth factor receptors on macrovascular endothelial cells mediate relaxation via nitric oxide in rat aorta". *J Clin Invest*, 1992 Mar;89(3):878-82.
  - Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL. *Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation*. *J Cell Biol*. 1994 Nov;127(4):915-34.
  - Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery". *Cell*, 1997 Oct 17; 91(2):231-41.
  - de Melker AA, van der Horst G, Calafat J, Jansen H, Borst J. *c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route*. *J Cell Sci*. 2001 Jun;114(Pt 11):2167-78.
  - Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, Bergeron JJ "Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma". *EMBO J*, 1994 Sep 15; 13(18):4269-77.
  - Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL "Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover". *Nat Cell Biol*, 2003. May; 5(5):410-21.
  - Ding H, Wu X, Kim I, Tam PP, Koh GY, Nagy A "The mouse *Pdgfc* gene: dynamic expression in embryonic tissues during organogenesis". *Mech Dev*, 2000 Sep;96(2):209-13.
  - Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, Devare SD, Robbins KC, Aaronson SA, Antoniades HN "Simian sarcoma virus *onc* gene, *v-sis*, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor". *Science*, 1983 Jul 15; 221(4607):275-7.
  - Downward J "Ras signalling and apoptosis" *Curr Opin Genet Dev*, 1998 Feb; 8(1):49-54.
  - Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME "Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt". *Science*, 1997 Jan 31; 275(5300):661-5.
  - Duyndam MC, Hulscher TM, Fontijn D, Pinedo HM, Boven E. *Induction of vascular endothelial growth factor expression and hypoxia-inducible factor 1alpha protein by the oxidative stressor arsenite*. *J Biol Chem*. 2001 Dec 21;276(51):48066-76.
  - Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. *Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences*. *J Biol Chem*. 1995 Dec 8;270(49):29083-9.
  - Eckhart AD, Yang N, Xin X, Faber JE. *Characterization of the alpha1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 19;94(17):9487-92.
  - Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. *A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 29;94(9):4273-8
  - Enge M, Bjarnegard M, Gerhardt H, Gustafsson E, Kalen M, Asker N, Hammes HP, Shani M, Fassler R, Betsholtz C "Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy". *EMBO J*, 2002; 21:4307-16.
  - Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. *C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*. *Cell*. 2001 Oct 5;107(1):43-54
  - Eriksson A, Siegbahn A, Westermark B, Heldin CH, Claesson-Welsh L "PDGF alpha and beta-receptors activate unique and common signal transduction pathways". *EMBO J*, 1992 Feb; 11(2):543-50.
  - Fantl WJ, Escobedo JA, Williams LT "Mutations of the platelet-derived growth factor receptor that cause a loss of ligand-induced conformational change, subtle changes in kinase activity, and impaired ability to stimulate DNA sintesis". *Mol Cell Biol*, 1989 Oct; 9(10):4473-8.
  - Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, Capogrossi MC, Martelli F. *MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3*. *J Biol Chem*. 2008 Jun 6;283(23):15878-83.

- Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. *Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2*. *Cancer Res*. 1999 Aug 15;59(16):3915-8.
- Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ. *Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 5;91(14):6496-500.
- Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. *Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements*. *J Biol Chem*. 1995 Sep 8;270(36):21021-7
- Fischer WH, Schubert D “Characterization of a novel platelet-derived growth factor-associated protein”. *J Neurochem*, 1996 May; 66(5):2213-6.
- Fleming TP, Matsui T, Molloy CJ, Robbins KC, Aaronson SA “Autocrine mechanism for v-sis transformation requires cell surface localization of internally activated growth factor receptors”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989 Oct; 86(20):8063-7.
- Fleming TP, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Oldfield EH, Aaronson SA, Ali IU “Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors”. *Cancer Res*, 1992 Aug 15; 52(16):4550-3.
- Fruttiger M, Calver AR, Kruger WH, Mudhar HS, Michalovich D, Takakura N, Nishikawa S, Richardson WD “PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina”. *Neuron*, 1996 Dec;17(6):1117-31.
- Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, Abramsson A, Calver AR, Bostrom H, Willetts K, Bertold CH, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD “Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice”. *Development*, 1999 Feb;126(3):457-67.
- Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. *Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells*. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):38205-11.
- Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. *Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1*. *Cancer Res*. 2003 May 1;63(9):2330-4.
- Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV. *Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression*. *J Biol Chem*. 2001 Mar 16;276(11):7919-26.
- Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouyssegur J, Yaniv M, Mechta-Grigoriou F. *JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress*. *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):781-94.
- Gibson SL, Bindra RS, Glazer PM. *Hypoxia-induced phosphorylation of Chk2 in an ataxia telangiectasia mutated-dependent manner*. *Cancer Res*. 2005 Dec 1;65(23):10734-41.
- Gilbertson DG, Duff ME, West JW, Kelly JD, Sheppard PO, Hofstrand PD, Gao Z, Shoemaker K, Bukowski TR, Moore M, Feldhaus AL, Humes JM, Palmer TE, Hart CE “Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds the PDGF alpha and beta receptors”. *J Biol Chem*, 2001 Jul 20; 276(29):27406-14.
- Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS. *Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia*. *Mol Cell Biol*. 2003 Jan;23(1):359-69.
- Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. *Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein*. *Science*. 1988 Dec 9;242(4884):1412-5.
- Goldberg MA, Schneider TJ. *Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin*. *J Biol Chem*. 1994 Feb 11;269(6):4355-9
- Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG “Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation”. *Cell*, 1994 Apr 22; 77(2):307-16.
- Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. *HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation*. *Cancer Cell*. 2007 Aug;12(2):108-13.
- Gotoh N, Toyoda M, Shibuya M “Tyrosine phosphorylation sites at amino acids 239 and 240 of Shc are involved in epidermal growth factor-induced mitogenic signaling that is distinct from Ras/mitogen-activated protein kinase activation”. *Mol Cell Biol*. 1997 Apr;17(4):1824-31.
- Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ Jr, Giaccia AJ. *Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status*. *Mol Cell Biol*. 1994 Sep;14(9):6264-77.

- Graf K, Xi XP, Yang D, Fleck E, Hsueh WA, Law RE “Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells”. *Hypertension*, 1997 Jan; 29(1 Pt 2):334-9.
- Gray K, Eitzman B, Raszmann K, Steed T, Geboff A, McLachlan J, Bidwell M “Coordinate regulation of diethylstilbestrol of platelet-derived growth factor-A (PDGF-A) and B (PDGF-B) chains and the PDGF receptor  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits in the mouse uterus and vagina: potential mediators of estrogen action”. *Endocrinology*, 1995 May; 136(5):2325-40.
- Greco A, Fusetti L, Villa R, Sozzi G, Minoletti F, Mauri P, Pierotti MA “Transforming activity of the chimeric sequence formed by the fusion of collagen gene COL1A1 and the platelet derived growth factor b-chain gene in dermatofibrosarcoma protuberans”. *Oncogene*, 1998 Sep 10; 17(10):1313-9.
- Green SL, Freiberg RA, Giaccia AJ. *p21(Cip1) and p27(Kip1) regulate cell cycle reentry after hypoxic stress but are not necessary for hypoxia-induced arrest*. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb;21(4):1196-206.
- Grün D, Wang YL, Langenberger D, Gunsalus KC, Rajewsky N. *microRNA target predictions across seven Drosophila species and comparison to mammalian targets*. *PLoS Comput Biol*. 2005 Jun;1(1):e13.
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. *Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha* *Gene Expr*. 1998;7(3):205-13.
- Hackenbeck T, Knaup KX, Schietke R, Schödel J, Willam C, Wu X, Warnecke C, Eckardt KU, Wiesener MS. *HIF-1 or HIF-2 induction is sufficient to achieve cell cycle arrest in NIH3T3 mouse fibroblasts independent from hypoxia*. *Cell Cycle*. 2009 May 1;8(9):1386-95.
- Haddad JJ, Land SC. *A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha*. *FEBS Lett*. 2001 Sep 14;505(2):269-74.
- Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I. *Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation*. *Nat Cell Biol*. 2003 May;5(5):461-6.
- Haisa M, Okochi H, Grotendorst GR “Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF”. *J Invest Dermatol*, 1994 Oct;103(4):560-3.
- Hammond EM (a), Dorie MJ, Giaccia AJ. *ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation*. *Biol Chem*. 2003 Apr 4;278(14):12207-13.
- Hammond EM (b), Green SL, Giaccia AJ. *Comparison of hypoxia-induced replication arrest with hydroxyurea and aphidicolin-induced arrest*. *Mutat Res*. 2003 Nov 27;532(1-2):205-13.
- Hannink M, Donoghue DJ “Autocrine stimulation by the v-sis gene product requires a ligand-receptor interaction at the cell surface”. *J Cell Biol*. 1988 Jul;107(1):287-98.
- Hansen K, Johnell M, Siegbahn A, Rorsman C, Engstrom U, Wernstedt C, Heldin CH, Ronnstrand L, “Mutation of a Src phosphorylation site in the PDGF L-receptor leads to increased PDGF-stimulated chemotaxis but decreased mitogenesis”. *EMBO J*, 1996 Oct 1; 15(19):5299-313.
- Harlan JM, Thompson PJ, Ross RR, Bowen-Pope DF “Alpha-thrombin induces release of platelet-derived growth factor-like molecule(s) by cultured human endothelial cells”. *J Cell Biol*, 1986 Sep;103(3):1129-33.
- Harmon KR, Witkop CJ, White JG, King RA, Peterson M, Moore D, Tashjian J, Marinelli WA, Bitterman PB “Pathogenesis of pulmonary fibrosis: platelet-derived growth factor precedes structural alterations in the Hermansky-Pudlak syndrome”. *J Lab Clin Med*, 1994 Apr; 123(4):617-27.
- Haugh JM, Huang AC, Wiley HS, Wells A, Lauffenburger DA. *Internalized epidermal growth factor receptors participate in the activation of p21(ras) in fibroblasts*. *J Biol Chem*. 1999 Nov 26;274(48):34350-60.
- Hawkins PT, Eguinoa A, Qiu RG, Stokoe D, Cooke T, Walters R, Wennstrom S, Claesson-Welsh L, Evans T, Symons M, Stephens L “PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase”. *Curr Biol*, 1995 Apr 1; 5(4):393-403.
- Heideran MA, Beeler JF, Yu JC, Ishibashi T, La Rochelle WJ, Pierce JH, Aaronson SA “Differences in substrate specificities of alpha and beta platelet-derived growth factor (PDGF) receptors. Correlation with their ability to mediate PDGF transforming function”. *J Biol Chem*, 1993 May 5; 268(13):9287-95.

- Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA "PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 2003 Jan 31; 299(5607):708-10.
- Heldin CH "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction". *Cell*, 1995 Jan 27; 80(2):213-23.
- Heldin CH, Ernuld A, Rorsman C, Ronnstrand L "Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation". *J Biol Chem*, 1989 May 25; 264(15):8905-12.
- Heldin CH, Westermark B, Wasteson A "Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization". *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979 Aug; 76(8):3722-6.
- Heldin P, Laurent TC, Heldin CH "Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts". *Biochem J*, 1989 Mar 15; 258(3):919-22.
- Heldin P, Pertoft H, Nordlinder H, Heldin CH, Laurent TC "Differential expression of platelet-derived growth factor alpha- and beta- receptors on fat-storing cells and endothelial cells of rat liver". *Exp Cell Res*, 1991 Apr; 193(2):364-9.
- Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C "Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis". *J. Cell. Biol.*, 2001; 153:543-53.
- Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramson A, Betsholtz C "Role of PDGF B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse". *Development*, 1999; 126:3047-55.
- Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nister M "Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops". *Cancer Res*, 1992 Jun 1; 52(11):3213-9.
- Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermark B, Heldin CH, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A, Nister M "Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas". *Cancer Res*, 1996 Jan 1; 56(1):164-71.
- Hinshaw JE, Schmid SL. *Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding*. *Nature*. 1995 Mar 9;374(6518):190-2.
- Hirota S, Ohashi A, Nishida T, Isozaki K, Kinoshita K, Shinomura Y, Kitamura Y "Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors". *Gastroenterology*, 2003 Sep; 125(3):660-7.
- Hirsch E, Iglesias A, Potocnik AJ, Hartmann U, Fassler R "Impaired migration but not differentiation of hematopoietic stem cells in the absence of  $\beta 1$  integrins". *Nature*, 1996 Mar 14; 380(6570):171-5.
- Ho L, Symes K, Yordan C, Gudas LJ, Mercola M "Localization of PDGF A and PDGFRalpha mRNA in *Xenopus* embryos suggests signalling from neural ectoderm and pharyngeal endoderm to neural crest cells". *Mech. Dev.*, 1994; 48:165-74.
- Hooshmand-Rad R, Claesson-Welsh L, Wennstrom S, Yokote K, Siegbahn A, Heldin CH "Involvement of phosphatidylinositide 3'-kinase and Rac in platelet-derived growth factor-induced actin reorganization and chemotaxis". *Exp Cell Res*, 1997 Aug 1; 234(2):434-41.
- Horr e N, Gort EH, van der Groep P, Heintz AP, Vooijs M, van Diest PJ. *Hypoxia-inducible factor 1 alpha is essential for hypoxic p27 induction in endometrioid endometrial carcinoma*. *J Pathol*. 2008 Jan;214(1):38-45.
- Hu CJ, Iyer S, Sataur A, Covello KL, Chodosh LA, Simon MC. *Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells*. *Mol Cell Biol*. 2006 May;26(9):3514-26.
- Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA. *Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Apr 28;245(3):894-9.
- Hu Q, Klippel A, Muslin AJ, Fantl WJ, Williams LT "Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase". *Science*, 1995 Apr 7; 268(5207):100-2.
- Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong CK, Cai G, Gu D, Ji Y, Zhao C, Wang J, Yang BB, Zhang Y. *MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia*. *PLoS One*. 2006 Dec 27;1:e116.

- Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS. *Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3*. J Biol Chem. 2002 Oct 18;277(42):39792-800.
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 7;95(14):7987-92.
- Hubbard SR "Structural analysis of receptor tyrosine kinases". Prog Biophys Mol Biol, 1999; 71(3-4):343-58.
- Hubbard SR "Theme and variations: juxtamembrane regulation of receptor tyrosine kinases". Mol Cell, 2001 Sep; 8(3):481-2.
- Hubbard SR, Mohammadi M, Schlessinger J "Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases". J Biol Chem, 1998 May 15; 273(20):11987-90.
- Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T, Aizawa S "Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice". Nature 1995 Oct 12; 377(6549):539-44.
- Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG Jr, Goldberg MA. *Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 1;93(20):10595-9.
- Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG Jr. *pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Sep 29;95(20):11661-6.
- Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM. *Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway*. J Biol Chem. 2002 Aug 16;277(33):29936-44.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. *HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing*. Science. 2001 Apr 20;292(5516):464-8.
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. *Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha*. Genes Dev. 1998 Jan 15;12(2):149-62.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. Science. 2001 Apr 20;292(5516):468-72.
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. *Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation*. Cell. 2002 Nov 27;111(5):709-20
- Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. *V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression*. Cancer Res. 1997 Dec 1;57(23):5328-35.
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. *Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem. 1996 Jul 26;271(30):17771-8.
- Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. *Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O2 tension*. Am J Physiol. 1996 Oct;271(4 Pt 1):C1172-80.
- Jin J, Cai Y, Li B, Conaway RC, Workman JL, Conaway JW, Kusch T. Trends Biochem Sci. *In and out: histone variant exchange in chromatin*. 2005 Dec;30(12):680-7.
- Joly M, Kazlauskas A, Fay FS, Corvera S "Disruption of PDGF receptor trafficking by mutation of its PI-3 kinase binding sites". Science, 1994 Feb 4; 263(5147):684-7.
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. *Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha*. EMBO J. 1998 Nov 16;17(22):6573-86.
- Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. *Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 May 27;94(11):5667-72.
- Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW. *Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 12;97(19):10430-5.

- Kanakaraj P, Raj S, Khan SA, Bishayee S “Ligand-induced interaction between  $\alpha$ - and  $\beta$ -type platelet-derived growth factor (PDGF) receptors: role of receptor heterodimers in kinase activation”. *Biochemistry*, 1991 Feb 19; 30(7):1761-7.
- Karlsson L, Bondjers C, Betsholtz C “Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle”. *Development*, 1999 Jun;126(12):2611-21.
- Karlsson L, Lindahl P, Heath JK, Betsholtz C “Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis”. *Development*. 2000 Aug;127(16):3457-66.
- Kashishian A, Kazlauskas A, Cooper JA “Phosphorylation sites in the PDGF receptor with different specificities for binding GAP and PI3 kinase in vivo”. *EMBO J*, 1992 Apr; 11(4):1373-82.
- Kasper LH, Boussouar F, Boyd K, Xu W, Biesen M, Rehg J, Baudino TA, Cleveland JL, Brindle PK. *EMBO J. Two transactivation mechanisms cooperate for the bulk of HIF-1-responsive gene expression*. 2005 Nov 16;24(22):3846-58.
- Kasper LH, Brindle PK. *Mammalian gene expression program resiliency: the roles of multiple coactivator mechanisms in hypoxia-responsive transcription*. *Cell Cycle*. 2006 Jan;5(2):142-6.
- Kato H, Tamamizu-Kato S, Shibasaki F. *Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1alpha and increases transcriptional activity* *J Biol Chem*. 2004 Oct 1;279(40):41966-74.
- Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. *Receptor downregulation and multivesicular-body sorting*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Dec;3(12):893-905.
- Kauffmann Zeh A, Rodrigues-Viciano P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J, Evan G “Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB”. *Nature*, 1997 Feb 6; 385(6616):544-8.
- Kazlauskas A, Cooper JA “Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins”. *Cell*, 1989 Sep 22; 58(6):1121-33.
- Keating MT, Williams LT. “Autocrine stimulation of intracellular PDGF receptors in v-sis-transformed cells”. *Science*, 1988 Feb 19; 239(4842):914-6.
- Kessels MM, Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG, Qualmann B. *Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin*. *J Cell Biol*. 2001 Apr 16;153(2):351-66
- Kietzmann T, Roth U, Jungermann K. *Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes*. *Blood*. 1999 Dec 15;94(12):4177-85.
- Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, Kim KW. *Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes*. *Nat Med*. 2001 Apr;7(4):437-43.
- Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM “Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal”. *Am J Pathol*, 1998 May; 152(5):1259-69.
- Kline DD, Peng YJ, Manalo DJ, Semenza GL, Prabhakar NR. *Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 22;99(2):821-6.
- Klinghoffer RA, Hamilton TC, Hoch R, Soriano P “An allelic series at the PDGFalphaR locus indicates unequal contributions of distinct signaling pathways during development”. *Dev. Cell*, 2002; 2:103-13.
- Klinghoffer RA, Kazlauskas A “Identification of a putative Syp substrate, the PDGF $\beta$  receptor”. *J Biol Chem*, 1995 Sep 22; 270(38):22208-17.
- Knowles HJ, Mole DR, Ratcliffe PJ, Harris AL. *Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha by modulation of the labile iron pool in differentiating U937 macrophages: effect of natural resistance-associated macrophage protein 1*. *Cancer Res*. 2006 Mar 1;66(5):2600-7.
- Knudsen ES, Wang JY. *Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation*. *Mol Cell Biol*. 1997 Oct;17(10):5771-83.
- Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P, Semenza GL, Sitkovsky MV. *Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha - deficient chimeric mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 19;99(4):2170-4.
- Kondoh K, Torii S, Nishida E “Control of MAP kinase signaling to the nucleus”. *Chromosoma*, 2005 Jul; 114(2):86-91.
- Koritzinsky M, Seigneuric R, Magagnin MG, van den Beucken T, Lambin P, Wouters BG. *The hypoxic proteome is influenced by gene-specific changes in mRNA translation*. *Radiother Oncol*. 2005 Aug;76(2):177-86.

- Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. *Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death*. Dev Biol. 1999 May 15;209(2):254-67.
- Koyama N, Morisaki N, Saito Y, Yoshida S “Regulatory effects of platelet-derived growth factor-AA homodimer on migration of vascular smooth muscle cells”. J Biol Chem, 1992 Nov 15; 267(32):22806-12.
- Kranenburg O, Verlaan I, Moolenaar WH. *Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase*. J Biol Chem. 1999 Dec 10;274(50):35301-4.
- Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL. *Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1*. Cancer Res. 2003 Mar 1;63(5):1138-43.
- Krtolica A, Krucher NA, Ludlow JW. *Hypoxia-induced pRB hypophosphorylation results from downregulation of CDK and upregulation of PPI activities*. Oncogene. 1998 Nov 5;17(18):2295-304.
- Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M. *A microRNA signature of hypoxia*. Mol Cell Biol. 2007 Mar;27(5):1859-67.
- La Rochelle WJ, Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, Giese NA, Looker NA, Sullivan C, Boldog FL, Yang M, Vernet C, Burgess CE, Fernandes E, Deegler LL, Rittman B, Shimkets J, Shimkets RA, Rothberg JM, Lichenstein HS, “PDGF-D, a new protease-activated growth factor”. Nat. Cell. Biol., 2001 May; 3(5):517-21.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch*. Science. 2002 Feb 1;295(5556):858-61.
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. *HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression*. Mol Cell Biol. 2001 Jun;21(12):3995-4004.
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. *HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression*. Mol Cell Biol. 2001 Jun;21(12):3995-4004.
- Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM. *Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia*. J Biol Chem. 1997 Feb 28;272(9):5375-81.
- Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. *Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction*. N Engl J Med. 2000 Mar 2;342(9):626-33.
- Leveen, P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C “Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities”. Genes Dev.,1994; 8:1875-87.
- Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. *Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia*. J Biol Chem. 1995 Jun 2;270(22):13333-40.
- Li H, Fredriksson L, Li X, Eriksson U “PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor”. Oncogene, 2003 Mar 13; 22(10):1501-10.
- Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Backstrom G, Hellstrom M, Bostrom H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U “PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor”. Nat Cell Biol, 2000 May; 2(5):302-9.
- Libby P, Warner SJ, Salomon RN, Birinyi LK “Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth-muscle cells from human atheroma”. N Engl J Med, 1988 Jun 9; 318(23):1493-8.
- Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, Ni R, Taubman MB. *Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation*. Biochem Cell Biol. 2002;80(4):421-6.
- Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C “Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice”. Science, 1997; 277:242-45.
- Lindahl P, Karlsson L, Hellstrom M, Gebre-Medhin S, Willetts K, Heath JK, Betsholtz C “Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development”. Development, 1997 Oct;124(20):3943-53.

- Liu JP, Robinson PJ. *Dynamin and endocytosis*. *Endocr Rev*. 1995 Oct;16(5):590-607.
- Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. *Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth*. *Mol Cell*. 2006 Feb 17;21(4):521-31.
- Lokker NA, O'Hare JP, Barsoumian A, Tomlinson JE, Ramakrishnan V, Fretto LJ, Giese NA "Functional importance of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor extracellular immunoglobulin-like domains. Identification of PDGF binding site and neutralizing monoclonal antibodies". *J Biol Chem*, 1997 Dec 26; 272(52):33037-44.
- Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A. *Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1*. *J Biol Chem*. 2005 Dec 23;280(51):41928-39.
- Lu H, Forbes RA, Verma A. *Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis*. *J Biol Chem*. 2002 Jun 28;277(26):23111-5.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA "Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter". *Genes Dev*, 2001 Jun 1; 15(11):1311-33.
- Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. *FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity*. *Genes Dev*. 2001 Oct 15;15(20):2675-86.
- Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. *J Biol Chem. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus*. 2002 Sep 6;277(36):32405-8.
- Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. *Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT*. *Nature*. 1997 Mar 27;386(6623):403-7.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S "The protein kinase complement of human genome". *Science* 2002 Dec 6; 298(5600):1912-34.
- Markova B, Herrlich P, Rönstrand L, Böhmer FD "Identification of protein tyrosine phosphatases associating with the PDGF receptor". *Biochemistry*, 2003 Mar 11; 42(9):2691-9.
- Marmor M et Yarden Y. *Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases*. *Oncogene*. 2004 Mar 15;23(11):2057-70
- Martin C, Yu AY, Jiang BH, Davis L, Kimberly D, Hohimer AR, Semenza GL. *Cardiac hypertrophy in chronically anemic fetal sheep: Increased vascularization is associated with increased myocardial expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1*. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 Mar;178(3):527-34.
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. *Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation*. *EMBO J*. 2001 Sep 17;20(18):5197-206.
- Matsui T, Heidarani M, Miki T, Popescu N, La Rochelle W, Kraus M, Pierce J, Aaronson S "Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes". *Science*, 1989 Feb 10; 243(4892):800-4.
- Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M. *Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex* *J Biol Chem*. 2003 Mar 28;278(13):11032-40.
- McClintock DS, Santore MT, Lee VY, Brunelle J, Budinger GR, Zong WX, Thompson CB, Hay N, Chandel NS. *Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death*. *Mol Cell Biol*. 2002 Jan;22(1):94-104.
- Meisenhelder J, Suh PG, Rhee SG, Hunter T "Phospholipase C-gamma is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein kinases in vivo and in vitro". *Cell*, 1989 Jun 30; 57(7):1109-22.
- Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L. *A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter*. *J Exp Med*. 1995 Dec 1;182(6):1683-93.
- Meng TC, Fukada T, Tonks NK "Reversible oxidation of protein tyrosine phosphatases in vivo". *Mol Cell*, 2002 Feb; 9(2):387-99.
- Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J. *Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing*. *J Cell Sci*. 2003 Apr 1;116(Pt 7):1319-26.
- Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. *Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo*. *Lab Invest*. 1994 Sep;71(3):374-9.

- Miyazawa K, Backstrom G, Leppanen O, Persson C, Wernstedt C, Hellman U, Heldin CH, Ostman A "Role of immunoglobuline-like domains 2-4 of the platelet-derived growth factor  $\alpha$ -receptor in ligand-receptor complex assembly". J Biol Chem, 1998 Sep 25; 273(39):25495-502.
- Mondy JS, Lindner V, Miyashiro JK, Berk BC, Dean RH, Geary RL "Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo". Circ Res, 1997 Sep; 81(3):320-7.
- Mori S, Tanaka K, Omura S, Saito Y "Degradation process of ligand-stimulated platelet-derived growth factor beta-receptor involves ubiquitin-proteasome proteolytic pathway". J Biol Chem, 1995 Dec 8; 270(49):29447-52.
- Muhlberg AB, Warnock DE, Schmid SL. *Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase*. EMBO J. 1997 Nov 17;16(22):6676-83.
- Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. *Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency*. J Biol Chem. 2000 Jul 14;275(28):21048-54.
- Mustoe TA, Pierce GF, Morishima C, Deuel TF "Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model." J Clin Invest, 1991 Feb;87(2):694-703.
- Nguyen SV, Claycomb WC. *Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes*. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Nov 19;265(2):382-6.
- Nichols BJ, Kenworthy AK, Polishchuk RS, Lodge R, Roberts TH, Hirschberg K, Phair RD, Lippincott-Schwartz J. *Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex*. J Cell Biol. 2001 Apr 30;153(3):529-41.
- Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD, Riddle P "Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell". Nature, 1988 Jun; 333(6173):560-2
- Novak U, Mui A, Miyajima A, Paradiso L "Formation of STAT5-containing DNA binding complexes in response to colony-stimulating factor-1 and platelet-derived growth factor". J Biol Chem. 1996 Aug 2;271(31):18350-4
- Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, Smith TJ, Ramakrishnan S, Hütter J, Schramm M, Flamme I. *Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors*. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Aug 16;296(2):343-9.
- Ohlsson R, Falck P, Hellstrom M, Lindahl P, Bonstrom H, Franklin G, Ahrlund-Richter L, Pollard J, Soriano P, Betsholtz C "PDGF-B regulates the development of the labyrinthine layer of mouse fetal placenta". Dev. Biol., 1999; 212(1):124-36.
- Olivera A, Spiegel S "Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens". Nature, 1993 Oct 7; 365(6446):557-60.
- Omura T, Heldin CH, Ostman A "Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization". J Biol Chem, 1997 May 9; 272(19):12676-82.
- Orr-Urtreger A, Lonai P "Platelet-derived growth factor A and its receptor are expressed in separate, but adjacent cell layers of the mouse embryo". Development, 1992; 115:289-303.
- Ostman A, Bohmer FD "Regulation of receptor tyrosine kinases signaling by protein tyrosine phosphatases". Trends Cell Biol, 2001 Jun; 11(6):258-66.
- Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. *Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1*. Am J Physiol. 1998 Feb;274(2 Pt 1):L212-9.
- Parenti A, Donnini S, Morbidelli L, Granger HJ, Ziche M "The effect of linomide on the migration and the proliferation of capillary endothelial cells elicited by vascular endothelial growth factor". Br J Pharmacol, 1996 Oct; 119(4):619-21.
- Paulsson Y, Hammacher A, Heldin CH, Westermark B "Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts". Nature, 1987 Aug 20-26;328(6132):715-7.
- Pech M, Gazit A, Arnstein P, Aaronson SA "Generation of fibrosarcomas in vivo by a retrovirus that expresses the normal B chain of platelet-derived growth factor and mimics the alternative splice pattern of the v-sis oncogene". Proc Natl Acad Sci USA, 1989 Apr; 86(8):2693-7.
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. *Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER*. Nat Cell Biol. 2001 May;3(5):473-83.
- Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. *The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jul 18;97(15):8386-91.
- Pickering JG, Uniyal S, Ford CM, Chau T, Laurin MA, Chow LH, Ellis CG, Fish J, Chan BM "Fibroblast growth factor-2 potentiates vascular smooth muscle cell migration to platelet-derived

- growth factor: upregulation of alpha2beta1 integrin and disassembly of actin filaments". *Circ Res*, 1997 May; 80(5):627-37.
- Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF "Role of platelet-derived growth factor in wound healing". *J Cell Biochem*. 1991 Apr;45(4):319-26.
  - Pierce GF, Mustoe TA, Senior RM, Reed J, Griffin GL, Thomason A, Deuel TF "In vivo incisional wound healing augmented by platelet-derived growth factor and recombinant c-sis gene homodimeric proteins". *J Exp Med*, 1988 Mar 1;167(3):974-87.
  - Pierce GF, Tarpley JE, Allman RM, Goode PS, Serdar CM, Morris B, Mustoe TA, Vande Berg J "Tissue repair processes in healing chronic pressure ulcers treated with recombinant platelet-derived growth factor BB". *Am J Pathol*, 1994 Dec;145(6):1399-410.
  - Pinzani M, Milani S, Herbst H, DeFranco R, Grappone C, Gentilini A, Caligiuri A, Pellegrini G, Ngo DV, Romanelli RG, Gentilini P "Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis". *Am J Pathol*, 1996 Mar; 148(3):785-800.
  - Pluskey S, Wandless TJ, Walsh CT, Shoelson SE "Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains". *J Biol Chem*, 1995 Feb 17; 270(7):2897-900.
  - Pompili VJ, Gordon D, San H, Yang Z, Muller DW, Nabel GJ, Nabel EG "Expression and function of a recombinant PDGF B gene in porcine arteries". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Dec;15(12):2254-64.
  - Porfiri E, McCormick F "Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by phosphorylation of the ras exchange factor hSOS1". *J Biol Chem*, 1996 Mar 8; 271(10):5871-7.
  - Pringle NP, Richardson WD "A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development*, 1993;117(2):525-33.
  - Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. *Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit*. *J Biol Chem*. 1997 Apr 25;272(17):11205-14.
  - Pyne S, Chapman J, Steele L, Pyne NJ "Sphingomyelin-derived lipids differentially regulate the extracellular signal regulated kinase 2 (ERK-2) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signal cascades in airway smooth muscle". *Eur J Biochem*, 1996 May 1; 237(3):819-26.
  - Rakugi H, Tabuchi Y, Nakamaru M, Nagano M, Higashimori K, Mikami H, Ogihara T, Suzuki N. *Evidence for endothelin-1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Jun 29;169(3):973-7.
  - Rankin S, Rozengurt E, "Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125<sup>FAK</sup>) and paxillin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cell. Bell-shaped dose response and cross-talk with bombesin". *J Biol Chem* 1994 Jan 7; 269(1):704-10.
  - Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. *Genes Dev*. 2000 Jan 1;14(1):34-44.
  - Ray R, Chen G, Vande Velde C, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Gietz RD, Greenberg AH. *BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites*. *J Biol Chem*. 2000 Jan 14;275(2):1439-48.
  - Reuterdaahl C, Sundberg C, Rubin K, Funa K, Gerdin B "Tissue localization of beta receptors for platelet-derived growth factor and platelet-derived growth factor B chain during wound repair in humans". *J Clin Invest*, 1993 May;91(5):2065-75.
  - Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. *Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor*. *Science*. 1992 May 22;256(5060):1193-5.
  - Richard DE, Berra E, Gothié E, Roux D, Pouyssegur J. *p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1*. *J Biol Chem*. 1999 Nov 12;274(46):32631-7.
  - Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermark B, Dubois-Dalcq M "A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system". *Cell*, 1988 Apr ;53(2):309-19.
  - Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Robson LE, Pierce GF "Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers". *Lancet*, 1992 Jan 4;339(8784):23-5.
  - Roche S, McGlade J, Jones M, Gish GD, Pawson T, Courtneidge SA, "Requirement of phospholipase C- $\gamma$ , the tyrosine phosphatase Syp and the adaptor proteins Shc and Nck for

- PDGF-induced DNA synthesis: evidence for the existence of Ras-dependent and Ras-independent pathways". *EMBO J*, 1996 Sep 16; 15(18):4940-8.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J "Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras". *Cell*, 1997 May 2; 89(3):457-67.
  - Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. *Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1*. *J Biol Chem*. 1997 Aug 8;272(32):20055-62.
  - Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. *J Cell Sci. Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription*. 2005 Jan 15;118(Pt 2):301-11.
  - Rubin K, Tingstrom A, Hansson GK, Larsson E, Ronnstrand L, Klareskog L, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Fellstrom B, Terracio L "Induction of B-type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: possible implication for development of vascular proliferative lesions". *Lancet*, 1988 Jun 18;1(8599):1353-6.
  - Ryan HE, Lo J, Johnson RS. *HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization*. *EMBO J*. 1998 Jun 1;17(11):3005-15.
  - Salceda S, Caro J. *Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes*. *J Biol Chem*. 1997 Sep 5;272(36):22642-7.
  - Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, Caro J. *Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 alpha is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP*. *Mol Cell Biol*. 2002 May;22(9):2984-92.
  - Sasahara A, Kott JN, Sasahara M, Raines EW, Ross R, Westrum LE "Platelet-derived growth factor B-chain-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain". *Brain Res Dev Brain Res*, 1992 Jul 24;68(1):41-53.
  - Schatteman GC, Morrison-Graham K, Van Koppen A, Weston JA, Bowen-Pope DF "Regulation and role of PDGF receptor alpha-subunit expression during embryogenesis". *Development*, 1992; 115:123-31.
  - Schlessinger J "Cell signaling by receptor tyrosine kinase". *Cell*, 2000 Oct 13;103(2):211-25.
  - Schmaltz C, Hardenbergh PH, Wells A, Fisher DE. *Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia*. *Mol Cell Biol*. 1998 May;18(5):2845-54.
  - Schoenfeld A, Davidowitz EJ, Burk RD. *A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8817-22.
  - Schonherr E, Jarvelainen HT, Sandell LJ, Wight TN "Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells". *J Biol Chem*, 1991 Sep 15;266(26):17640-7.
  - Schwarzer R, Tondera D, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J. *REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase*. *Oncogene*. 2005 Feb 10;24(7):1138-49.
  - Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS. *Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells*. *Mol Cell Biol*. 2001 May;21(10):3436-44.
  - Seger R, Krebs EG "The MAPK signaling cascade". *FASEB J* 1995 Jun; 9(9):726-35. Review.
  - Seifert RA, Hart CE, Philips PE, Forstrom JW, Ross R, Murray M, Bowen-Pope DF "Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors". *J Biol Chem*, 1989 May 25; 264(15):8771-8.
  - Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A. *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. *J Biol Chem*. 1996 Dec 20;271(51):32529-37.
  - Semenza GL, Neufelt 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 Jul 1;88(13):5680-4.
  - Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. *Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia inducible factor 1*. *J Biol Chem*. 1994 Sep 23;269(38):23757-63.
  - Semenza GL, Wang GL. *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. *Mol Cell Biol*. 1992 Dec;12(12):5447-54.

- Shao R, Zhang FP, Tian F, Anders Friberg P, Wang X, Sjöland H, Billig H. *Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo*. FEBS Lett. 2004 Jul 2;569(1-3):293-300.
- Shilatifard A. *Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression*. Annu Rev Biochem. 2006;75:243-69.
- Shimizu A, O'Brien KP, Sjoblom T, Pietras K, Buchdunger E, Collins VP, Heldin CH, Dumanski JP, Ostman A. "The dermatofibrosarcoma protuberans-associated collagen type Ialpha1/platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain fusion gene generates a transforming protein that is processed to functional PDGF-BB". Cancer Res, 1999 Aug 1; 59(15):3719-23.
- Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP, Ross R "A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF". Cell, 1985 Nov;43(1):277-86.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature. 1992 Oct 29;359(6398):843-5.
- Siegbahn A, Hammacher A, Westermark B, Heldin CH "Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes". J. Clin. Invest., 1990 Mar; 85(3):916-20.
- Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P, Di Fiore PP, Polo S "Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos". Proc Natl Acad Sci USA, 2005 Feb 22; 102(8):2760-5.
- Simon MP, Pedeutour F, Sirvent N, Grosgeorge J, Minoletti F, Coindre JM, Terrier-Lacombe MJ, Mandahl N, Craver RD, Blin N, Sozzi G, Turc-Carel C, O'Brien KP, Kedra D, Fransson I, Guilbaud C, Dumanski JP "Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma". Nat Genet, 1997 Jan; 15(1):95-8.
- Smits A, Funa K, Vassbotn FS, Beausang-Linder M, af Ekenstam F, Heldin CH, Westermark B, Nister M "Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in proliferative disorders of fibroblastic origin". Am J Pathol, 1992 Mar; 140(3):639-48.
- Sonenberg N, Dever TE. *Eukaryotic translation initiation factors and regulators*. Curr Opin Struct Biol. 2003 Feb;13(1):56-63.
- Soriano P "Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF  $\beta$ -receptor mutant mice". Genes Dev., 1994; 8:1888-96.
- Soriano P "The PDGF  $\alpha$ -receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites". Development, 1997; 124:2691-700.
- Sorkin A, Eriksson A, Heldin CH, Westermark B, Claesson-Welsh L "Pool of ligand-bound platelet-derived growth factor beta-receptors remain activated and tyrosine phosphorylated after internalization". J Cell Physiol, 1993 Aug; 156(2):373-82.
- Souza P, Tanswell AK, Post M "Different roles for PDGF-alpha and -beta receptors in embryonic lung development". Am J Respir Cell Mol Biol, 1996 Oct; 15(4):551-62.
- Steed DL "Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers". Diabetic Ulcer Study Group. J Vasc Surg, 1995 Jan;21(1):71-8; discussion 79-81.
- Steer EJ, Cross NC "Myeloproliferative disorders with translocations of chromosome 5q31-35: role of the platelet-derived growth factor receptor Beta". Acta Haematol, 2002; 107(2):113-22.
- Su YC, Han J, Xu S, Cobb M, Skolnik EY "NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain". EMBO J, 1997 Mar 17; 16(6):1279-90.
- Sun T, Jayatilake D, Afink GB, Ataliotis P, Nister M, Richardson WD, Smith HK "A human YAC transgene rescues craniofacial and neural tube development in PDGFRalpha knockout mice and uncovers a role for PDGFRalpha in prenatal lung growth". Development, 2000; 127:1529-4519.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T "Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction". Science, 1995 Oct 13; 270(5234):296-9.
- Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T. *Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia*. Oncogene. 2001 Sep 13;20(41):5779-88.
- Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA. *Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells*. Carcinogenesis. 2001 Sep;22(9):1363-71.
- Takahashi Y, Takahashi S, Shiga Y, Yoshimi T, Miura T. *Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells*. J Biol Chem. 2000 May 12;275(19):14139-46.

- Tanaka S, Ouchi T, Hanafusa H “Downstream of Crk adaptor signaling pathway: activation of Jun kinase by v-Crk through the guanine nucleotide exchange protein C3G”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997 Mar 18;94(6):2356-61.
- Tang WW, Ulich TR, Lacey DL, Hill DC, Qi M, Kaufman SA, Van GY, Tarpley JE, Yee JS “Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis”. *Am J Pathol*, 1996 Apr; 148(4):1169-80.
- Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. *Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*. *EMBO J*. 2000 Aug 15;19(16):4298-309.
- Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. *The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development*. *Genes Dev*. 1998 Nov 1;12(21):3320-4.
- Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. *The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development*. *Genes Dev*. 1998 Nov 1;12(21):3320-4.
- Tian H, McKnight SL, Russell DW. *Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells*. *Genes Dev*. 1997 Jan 1;11(1):72-82.
- Twamley-Stein GM, Pepperkok R, Ansorge W, Courtneidge SA “The Src family tyrosine kinases are required for platelet-derived growth factor-mediated signal transduction in NIH 3T3 cells”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993 Aug 15; 90(16):7696-700.
- Uhrbom L, Hesselager G, Nister M, Westermark B “Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus”. *Cancer Res*, 1998 Dec 1; 58(23):5275-9.
- Ullrich A, Schlessinger J “Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity”. *Cell*, 1990 Apr 20; 61(2):203-12.
- Uutela M, Lauren J, Bergsten E, Li X, Horelli-Kuitunen N, Eriksson U, Alitalo K “Chromosomal location, exon structure, and vascular expression patterns of the human PDGFC and PDGFD genes”. *Circulation*, 2001 May 8; 103(18):2242-7.
- Varga-Weisz PD, Becker PB. *Curr Opin Genet Dev. Regulation of higher-order chromatin structures by nucleosome-remodelling factors*. 2006 Apr;16(2):151-6.
- Vender RL, Clemmons DR, Kwock L, Friedman M. *Reduced oxygen tension induces pulmonary endothelium to release a pulmonary smooth muscle cell mitogen(s)*. *Am Rev Respir Dis*. 1987 Mar;135(3):622-7.
- Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL “Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis”. *Science*, 1996 Dec 20; 274(5295):2086-9.
- Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL. *Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis*. *Science*, 1996 Dec 20; 274(5295):2086-9.
- Vignaud JM, Allam M, Martinet N, Pech M, Plenat F, Martinet Y “Presence of platelet-derived growth factor in normal and fibrotic lung is specifically associated with interstitial macrophages, while both interstitial macrophages and alveolar epithelial cells express the c-sis proto-oncogene”. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1991 Dec; 5(6):531-8.
- Volm M, Koomägi R. *Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer*. *Anticancer Res*. 2000 May-Jun;20(3A):1527-33.
- Wang F, Zhang R, Beischlag TV, Muchardt C, Yaniv M, Hankinson O. *Roles of Brahma and Brahma/SWI2-related gene 1 in hypoxic induction of the erythropoietin gene*. *J Biol Chem*. 2004 Nov 5;279(45):46733-41.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5510-4.
- Wang J, Coltrera MD, Gown AM “Cell proliferation in human soft tissue tumors correlates with platelet-derived growth factor B chain expression: an immunohistochemical and in situ hybridization study”. *Cancer Res*, 1994 Jan 15; 54(2):560-4.
- Wang XQ, Redpath JL, Fan ST, Stanbridge EJ. *ATR dependent activation of Chk2*. *J Cell Physiol*. 2006 Sep;208(3):613-9.
- Waterfield MD, Scrace GT, Whittle N, Stroobant P, Johnsson A, Wasteson A, Westermark B, Heldin CH, Huang JS, Deuel TF “Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus” *Nature*, 1983 Jul 7-13; 304(5921):35-9.
- Wells A, Marti U “Signaling shortcuts: cell surface receptors in the nucleus?”. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002 Sep; 20(3):581-7.

- Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, Schwartz SM, Gordon D “Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization”. *J Clin Invest*, 1988 Sep; 82(3):1134-43.
- Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL “Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture”. *J Clin Invest*. 1994 Oct; 94(4):1563-9.
- Yamamoto H, Crow M, Cheng L, Lakatta E, Kinsella J “PDGF receptor-to-nucleus signaling of p91 (STAT1 alpha) transcription factor in rat smooth muscle cells”. *Exp Cell Res*, 1996 Jan 10; 222(1):125-30.
- Yang J, Zhang L, Erbel PJ, Gardner KH, Ding K, Garcia JA, Bruick RK. *Functions of the Per/ARNT/Sim domains of the hypoxia-inducible factor*. *J Biol Chem*. 2005 Oct 28;280(43):36047-54.
- Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang-Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen EY, Ando ME, Harkins RN, Francke U, Friend VA, Ullrich A, Williams LT “Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors”. *Nature*, 1986 Sep 18-24; 323(6085):226-32.
- Yasinska IM, Sumbayev VV. *S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity*. *FEBS Lett*. 2003 Aug 14;549(1-3):105-9.
- Yokote K, Mori S, Siegbahn A, Ronnstrand L, Wernstedt C, Heldin CH, Claesson-Welsh L “Structural determinants in the platelet-derived growth factor alpha-receptor implicated in modulation of chemotaxis”. *J Biol Chem*, 1996 Mar 1; 271(9):5101-11.
- Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester JT, Semenza GL. *Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha*. *J Clin Invest*. 1999 Mar;103(5):691-6.
- Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ. *Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia*. *Dev Cell*. 2002 Mar;2(3):331-41.
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. *Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics*. *Cancer Res*. 2000 Mar 15;60(6):1541-5.
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases*. *Cancer Res*. 1999 Nov 15;59(22):5830-5.
- Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. *Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression*. *Genes Dev*. 2000 Feb 15;14(4):391-6.



