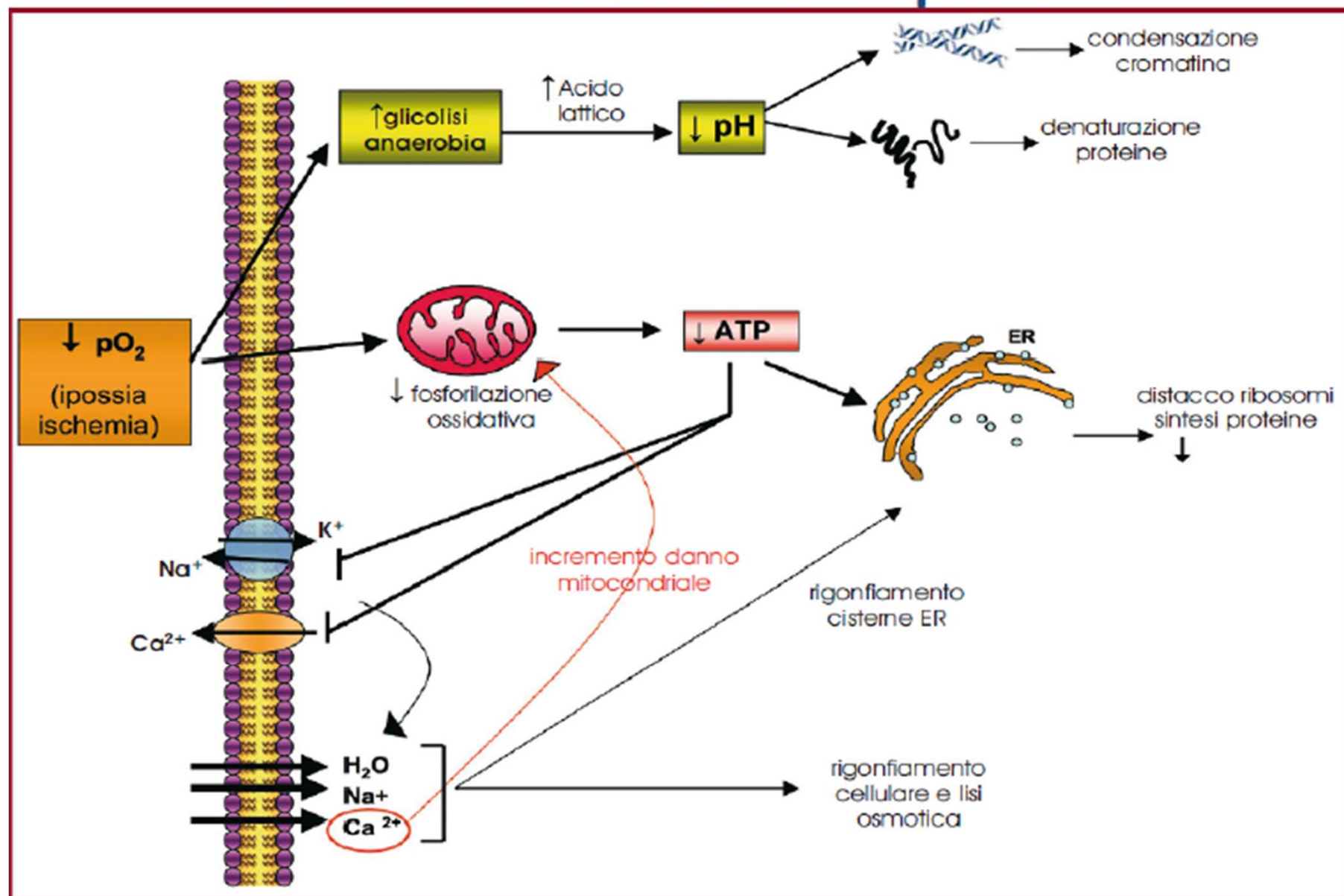


**Ipossia - Aspetti Fisiopatologici e
Modulazione Nutraceutica
dell'apporto di Ossigeno Cellulare**

**Tribute to Semenza- Ratcliffe - Kaelin
Nobel Prize in Medicine 2019**

**Mauro Miceli
Docenza Scienze Lab Biomediche
Polo Biomedico
Università di Firenze**

Meccanismi del danno ipossico



The NEW ENGLAND JOURNAL *of* MEDICINE

ARTICOLO DI RASSEGNA

MECCANISMI DELLA MALATTIA

Rilevazione di ossigeno, omeostasi e malattia

Gregg L. Semenza, M.D., Ph.D.

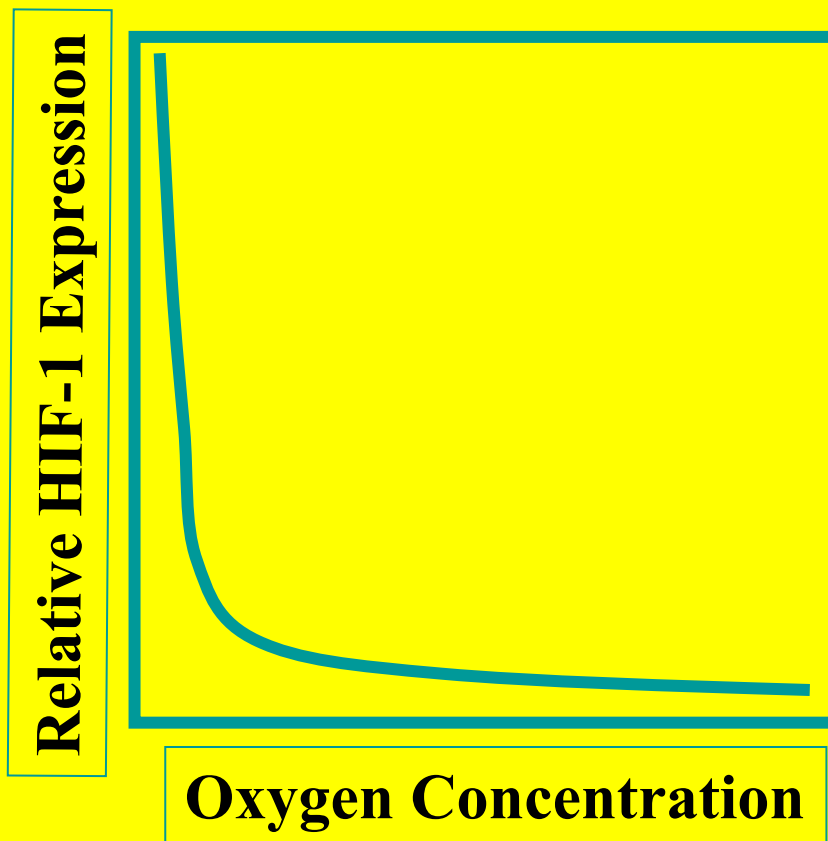
MECCANISMO DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE NELL'IPOSSIA

In ipossia le cellule attivano un tipico programma di espressione genica regolato principalmente dal **fattore di trascrizione indotto da ipossia HIF-1**

Fattori di trascrizione inducibili dall'ipossia (HIF)

- Le cellule possono adattarsi a condizioni di ipossia attivando specifiche vie di segnalazione intracellulare con il coinvolgimento di una famiglia di specifici fattori trascrizionali eterodimerici (hypoxia inducible factors, HIF).
- Di questa famiglia che include *HIF1*, *HIF2* e *HIF3*, il fattore più studiato è **HIF1** che ha espressione pressoché ubiquitaria e risulta costituito da due subunità:
 - **HIF1 α** - la cui espressione è sensibile alla concentrazione di ossigeno
 - **HIF1 β** - la cui espressione è costitutiva in pressoché tutte le cellule

➤ Protein Expression as a Function of [O₂]

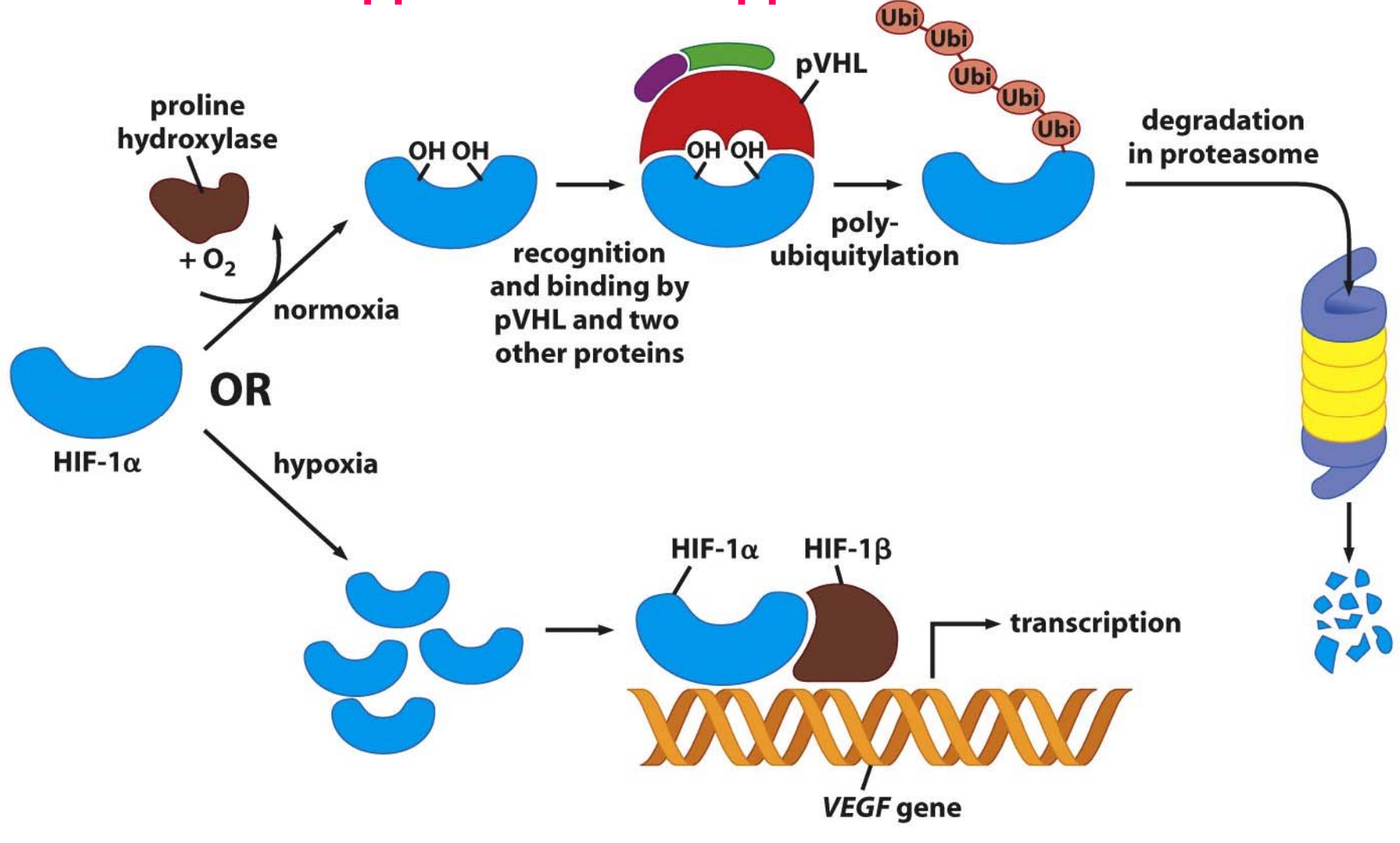


HIF-1 expression increases exponentially when O₂ concentration decreases. The curve shows a point of inflection around 4-5% O₂, which is the O₂ concentration in normal human tissues.

Semenza GL. (1997) *Kidney Int.* 51:553-555

Meccanismo d'azione di HIF1

The Von Hippel Landau Suppressor and HIF-1

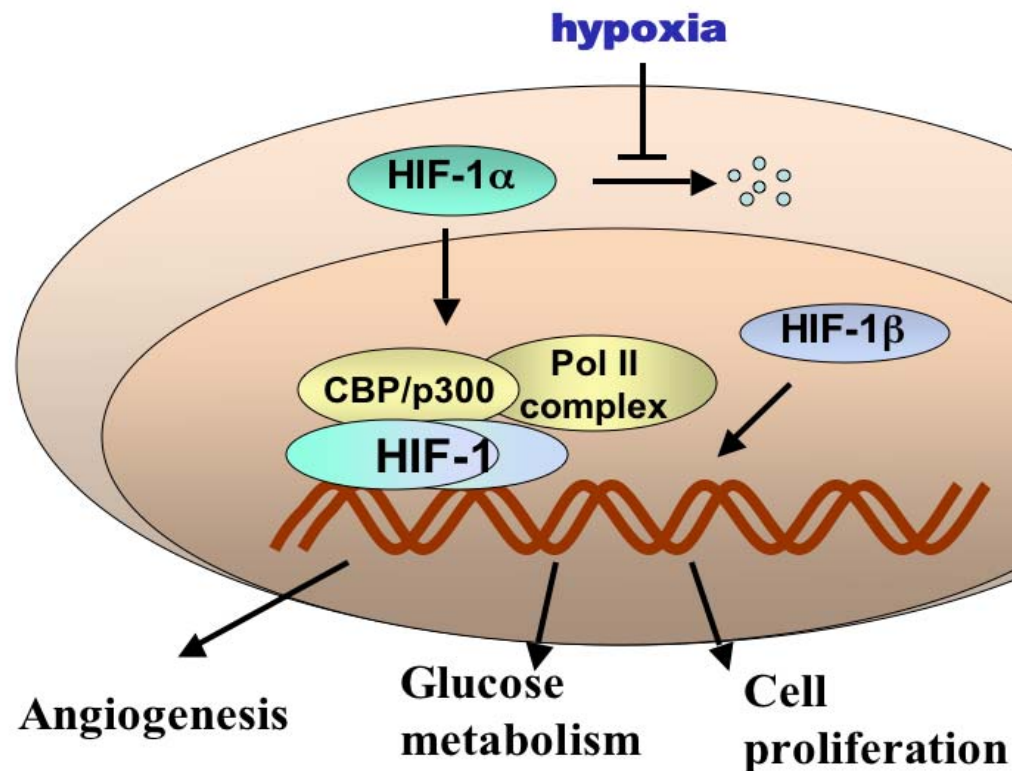


•VHL is a tumor suppressor gene on chromosome 3

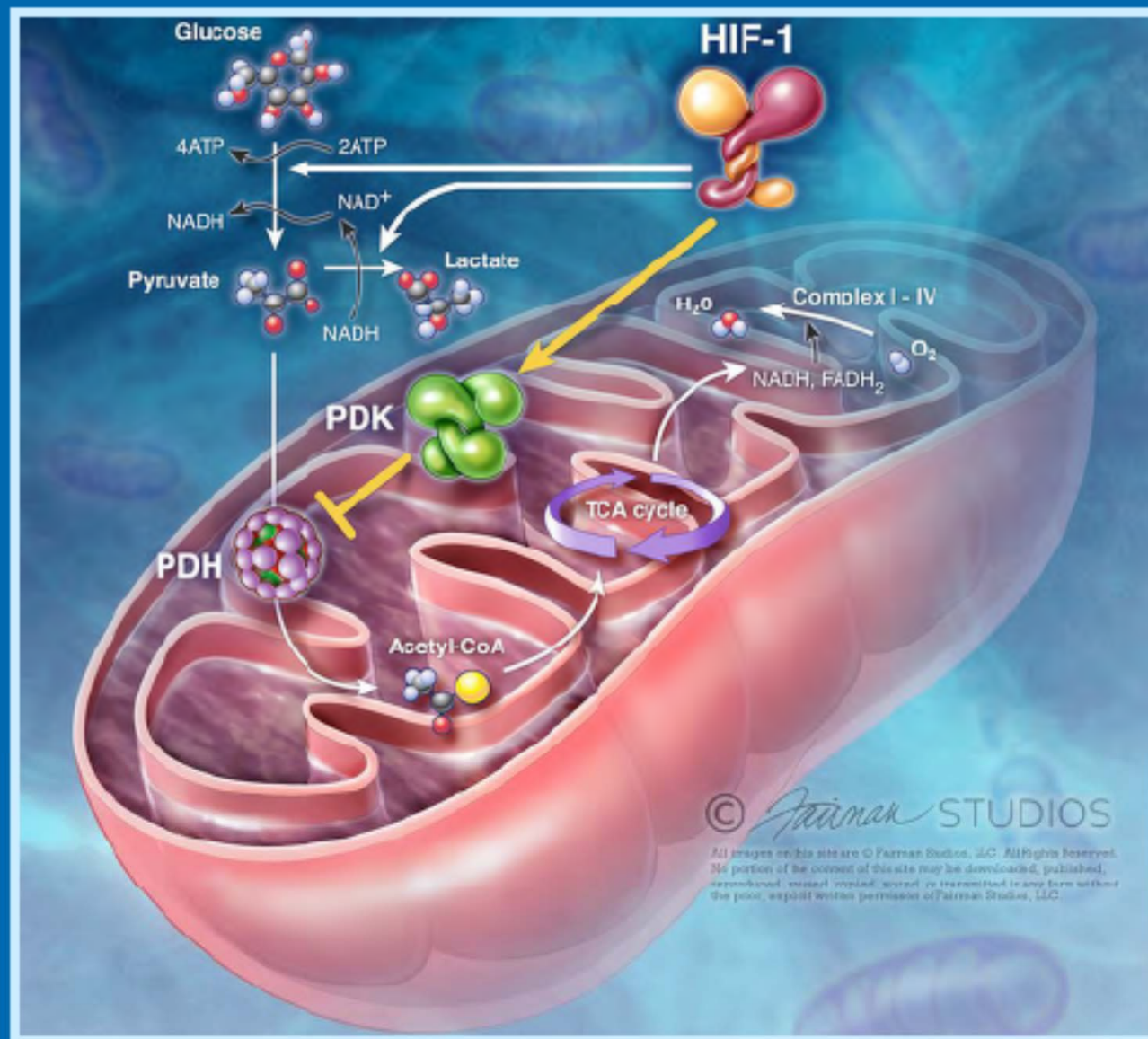
Prolyl hydroxylase is O₂- dependent

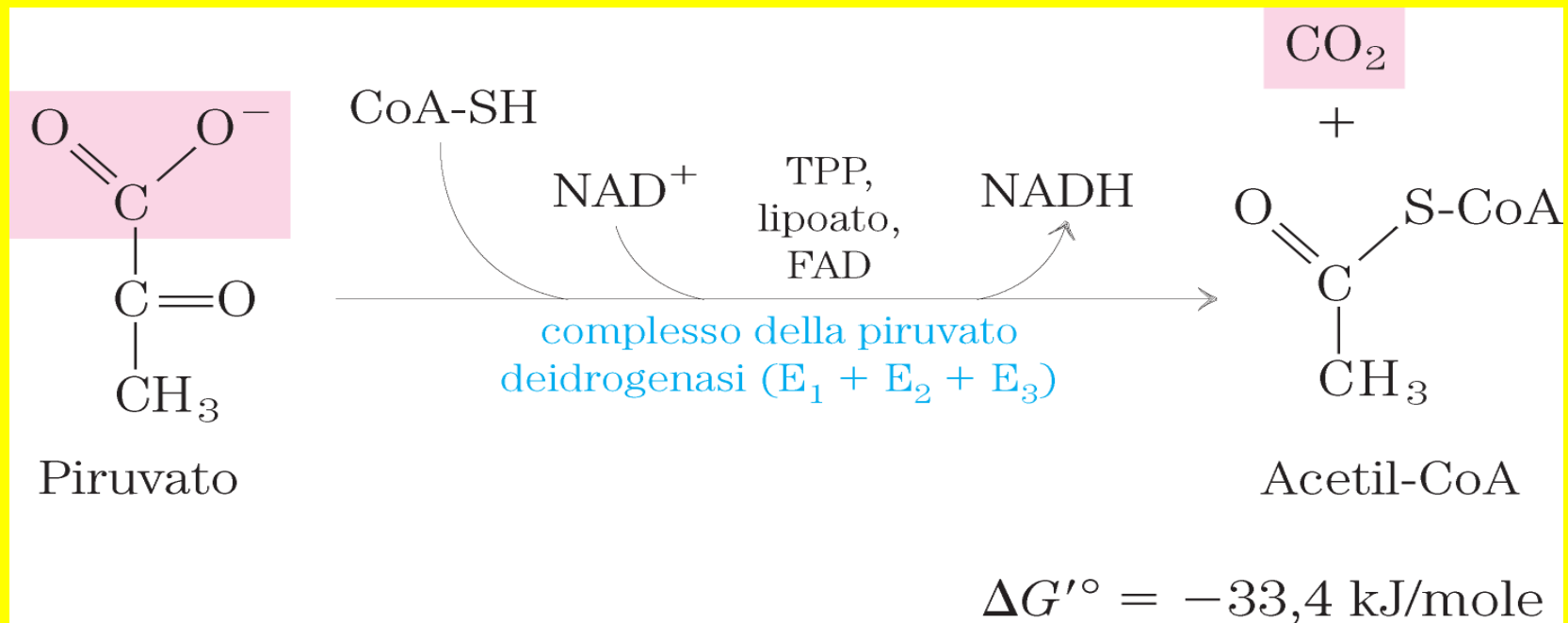
- The activation of prolyl hydroxylase depends on several co-factors such as O₂, Fe²⁺, α-ketoglutarate and ascorbate.
- Under hypoxia, prolyl hydroxylase cannot be activated. Thus :
- HIF-1 accumulates and translocates into nucleus.
In the nucleus, it binds to HIF-1β forming HIF-1.
- HIF-1 binds to co-activators CBP/p300 and is then activated.

In condizioni di ipossia HIF-1 α non viene degradato ma trasloca nel nucleo e dimerizza con HIF1- β . L'eterodimero interagisce con CBP/p300, riconosce e si lega alla sequenza nota come elemento regolatore dell'ipossia (HRE) presente sul promotore di geni indotti dall'ipossia, attivandone la loro trascrizione.



HIF-1 blocca l'ingresso del piruvato nel mitocondrio e favorisce la sua trasformazione in lattato





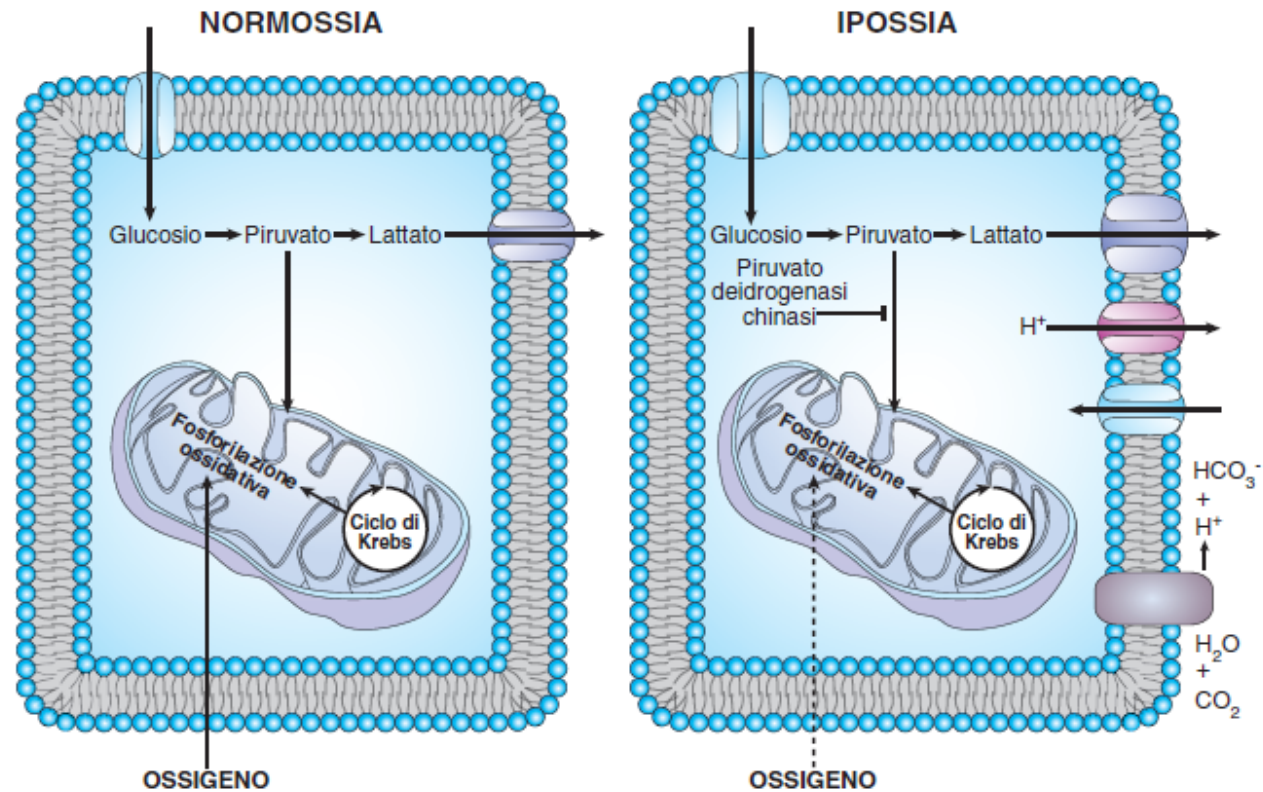
HIF-1 Attiva la piruvato deidrogenasi chinasi 1 (PDK1)

PDK1 fosforila la piruvato deidrogenasi inattivandola
 Ciò impedisce la conversione del piruvato in Acetil CoA e
 l'utilizzazione del piruvato da parte dei mitocondri.

Contributo di HIF all'effetto Warburg

Myc, che è attivato nel 40% dei tumori umani, coopera con
 HIF-1 nell'attivazione trascrizionale di PDK1

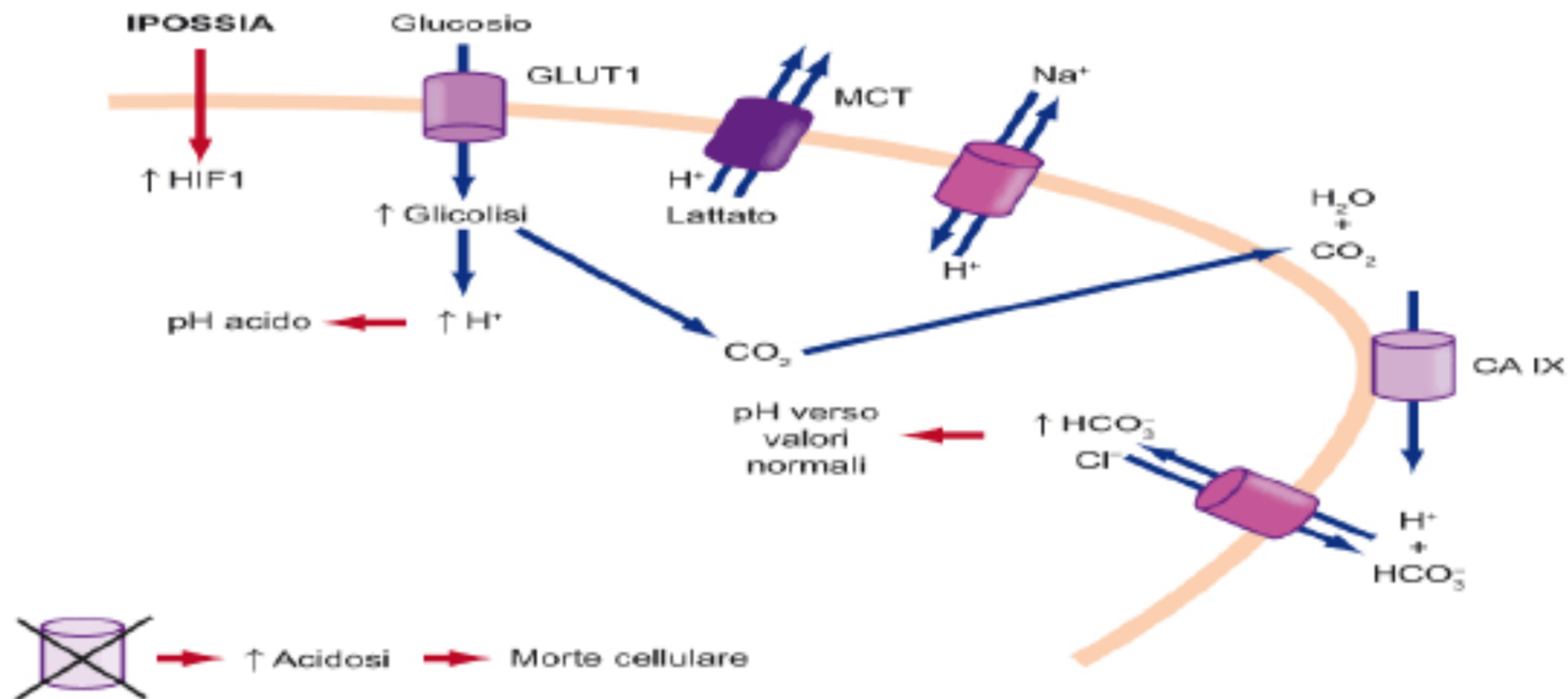
Ruolo di HIF nel metabolismo



Trasportatori del glucosio **GLUT1**, **GLUT3**
Enzimi della glicolisi
Piruvato deidrogenasi chinasi 1 (**PDK1**)

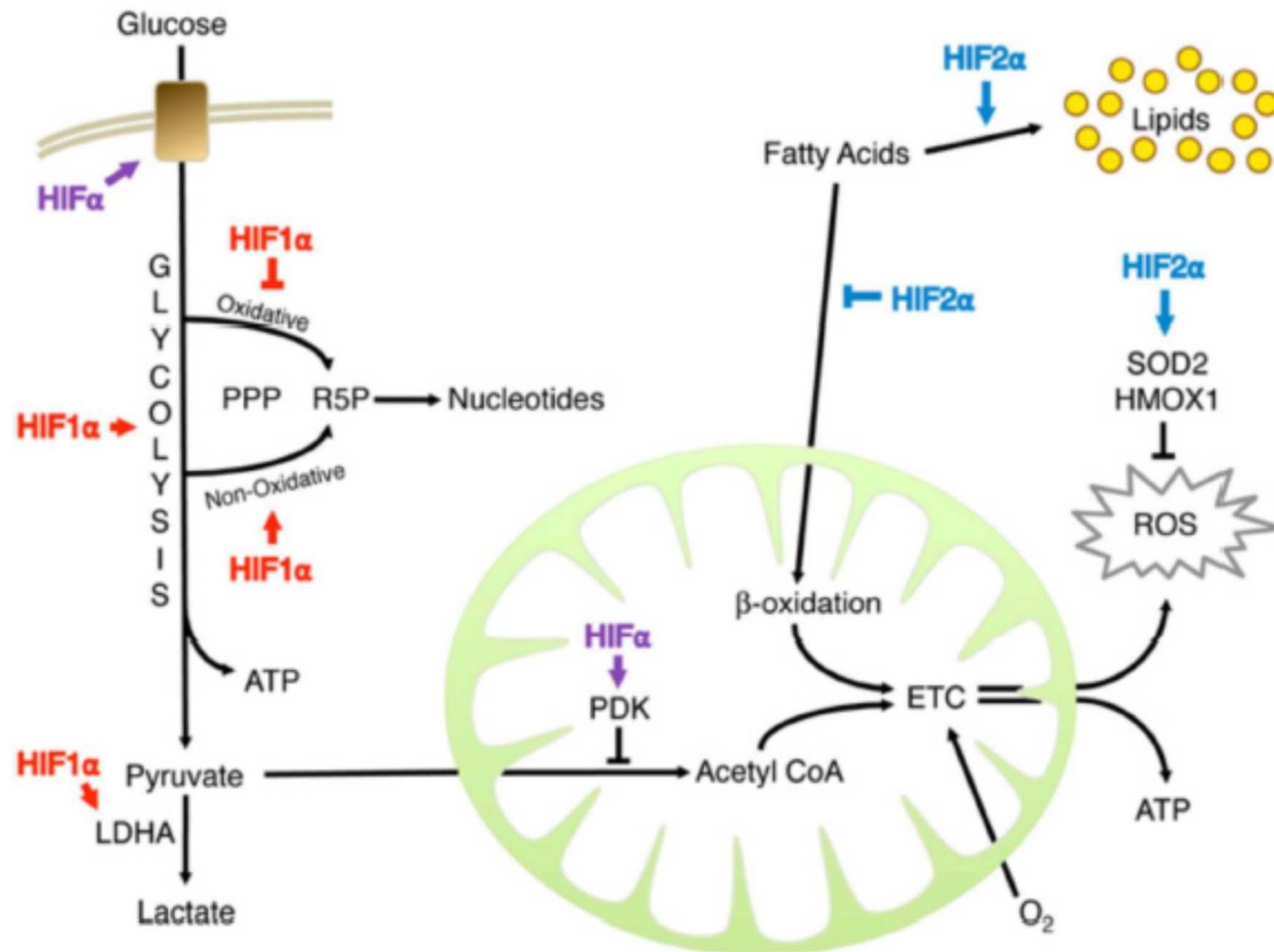
Trasportatori di acidi monocarbossilici e di **H⁺**
Anidrasi Carbonica 9

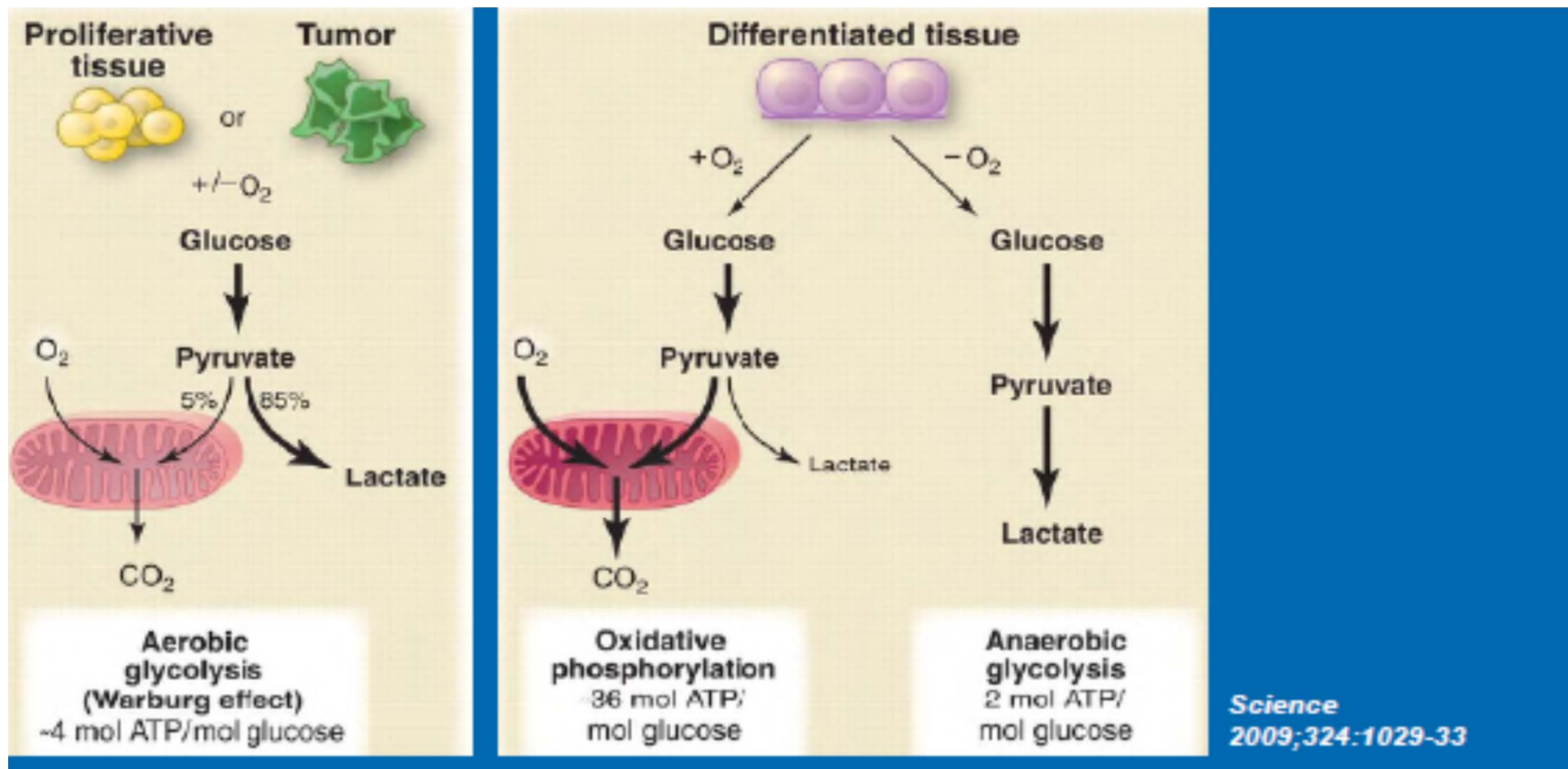
Meccanismo d'azione di HIF1



- o In condizioni di ipossia, l'induzione dei trasportatori del glucosio e degli enzimi glicolitici consente:
 - L'aumento della concentrazione intracellulare del glucosio.
 - Accelera i processi di glicolisi aerobia
- o L'aumento di ac. Lattico e CO₂ che possono determinare acidificazione del pH intracellulare è modulato dall'attivazione di pompe, scambiatori e trasportatori di membrana che equilibrano il pH intracellulare.

HIF α Control of Cell Metabolism

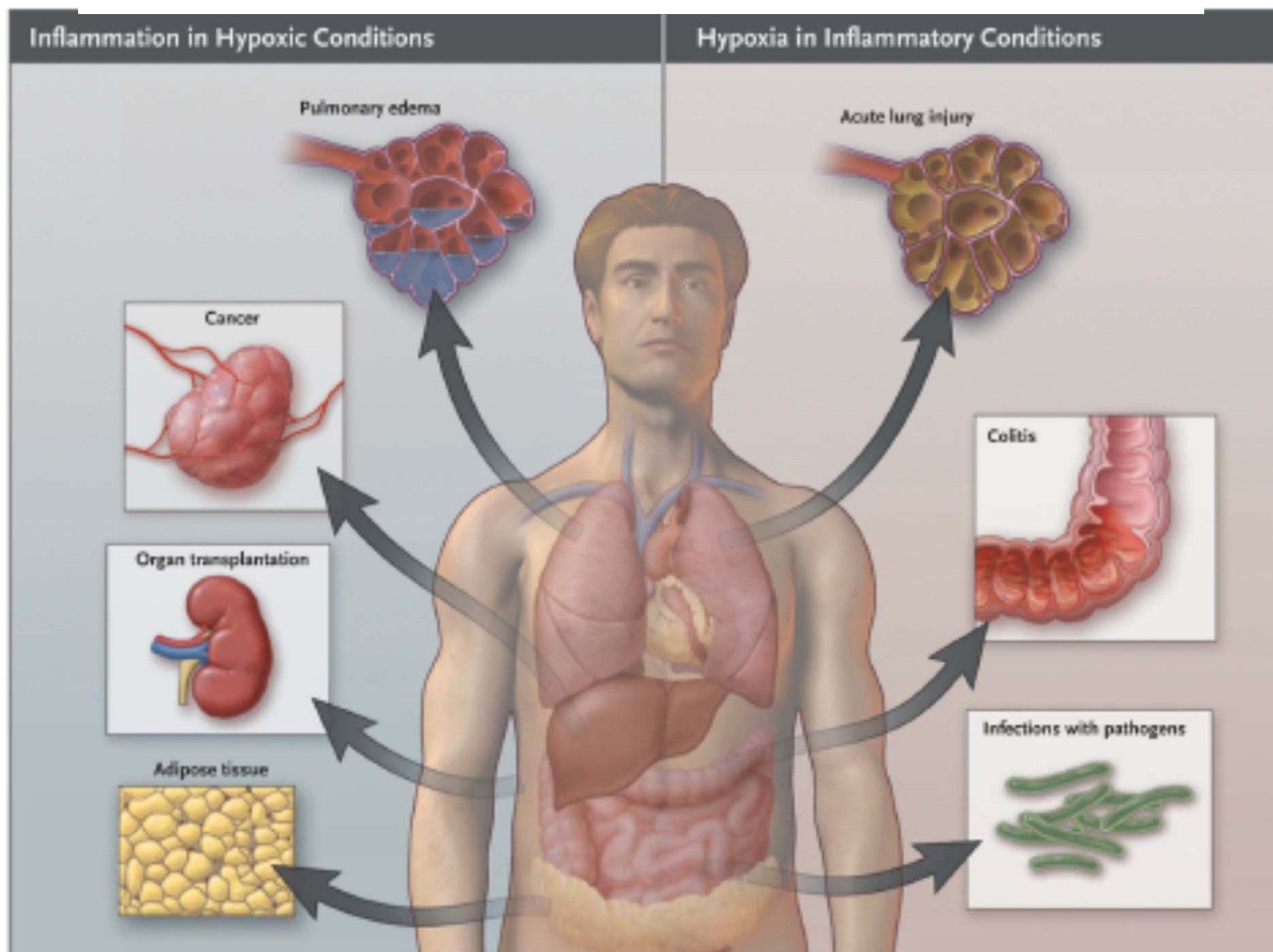


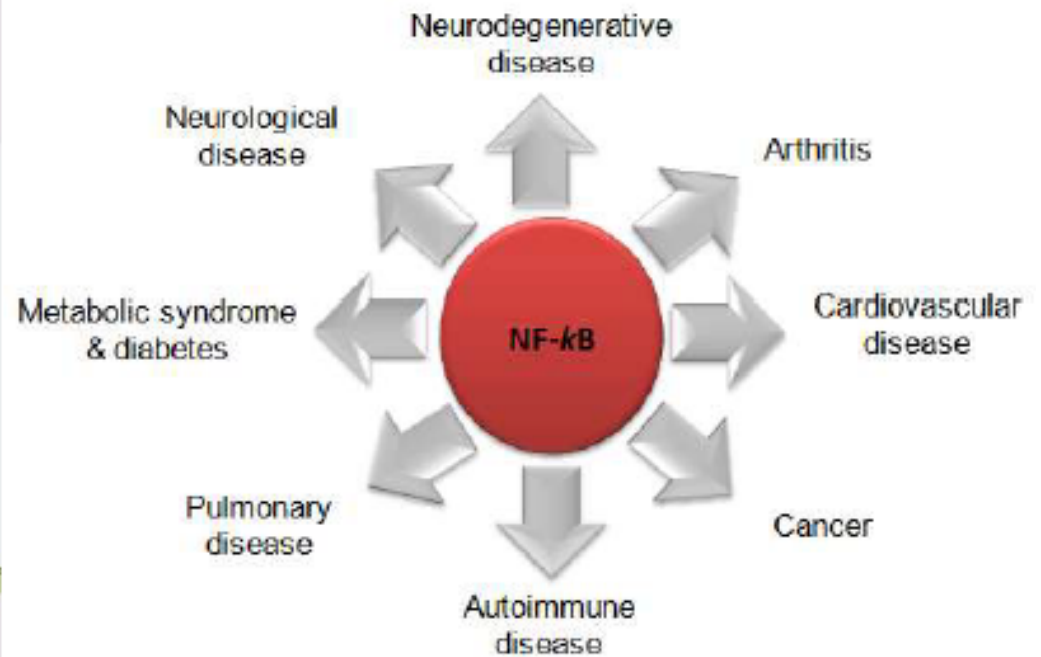
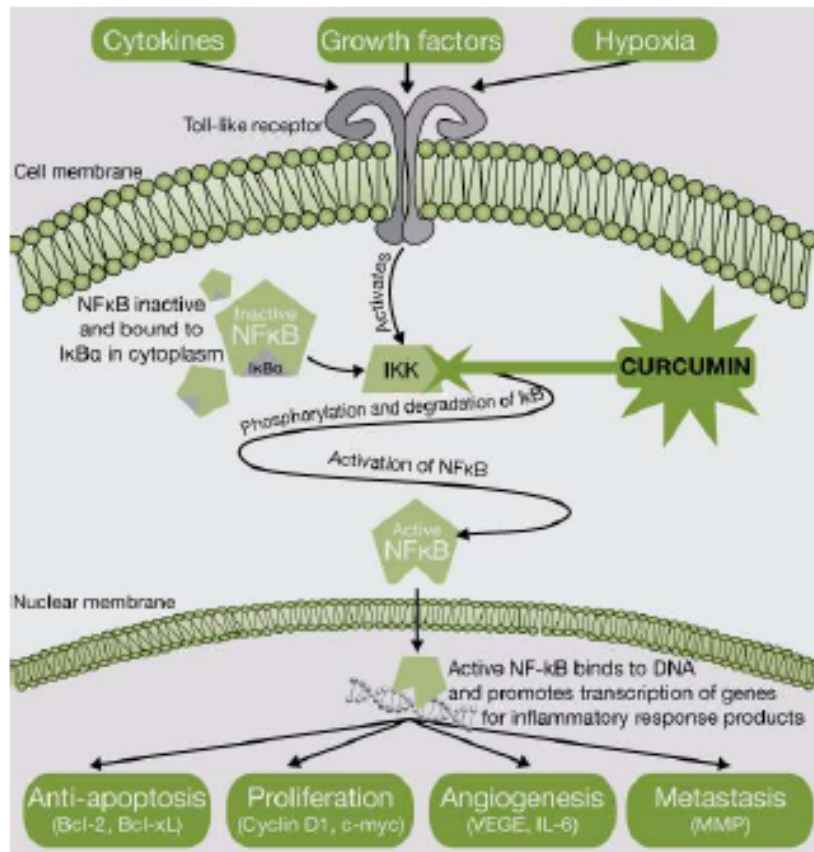


- ⇒ Spostamento del metabolismo energetico dai mitocondri (fosforilazione ossidativa) al citoplasma (glicolisi) con elevata produzione di lattato.
- ⇒ Soppressione dell'apoptosi (dipendente dalla produzione di energia mitocondriale) e resistenza alla morte cellulare.

Ruolo fondamentale del fattore ipossico HIF-1 α nel regolare l'espressione dei recettori per il glucosio e l'attività degli enzimi glicolitici.

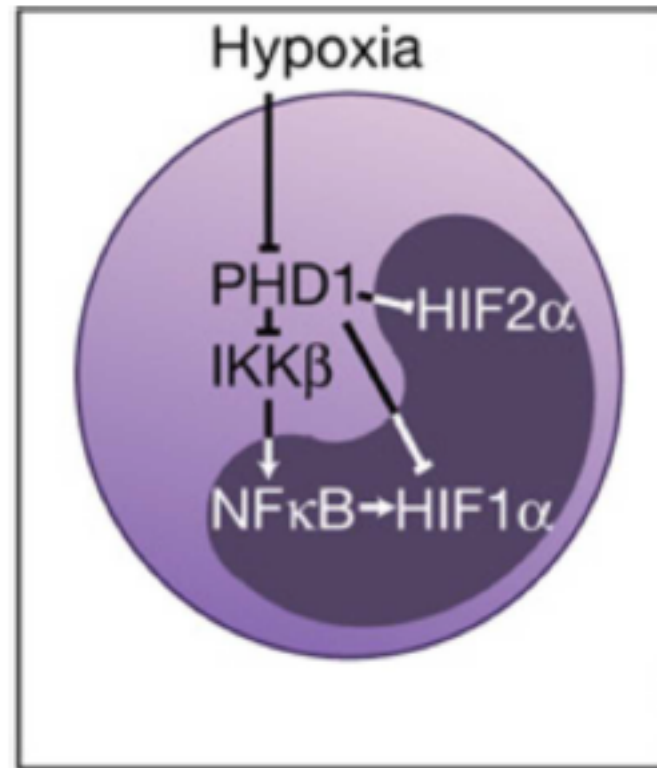
Hypoxia and inflammation are two sides of the same coin





NF-κB in chronic disease

Macrophage and Vascular Responses to HIF



In addition to direct HIF stabilization, hypoxic inhibition of PHDs results in IKK-mediated degradation of the NF κ B inhibitor I κ B.

Activated NF κ B directly transactivates HIF1 α

Hypoxia and Inflammation

High oxygen

Low oxygen

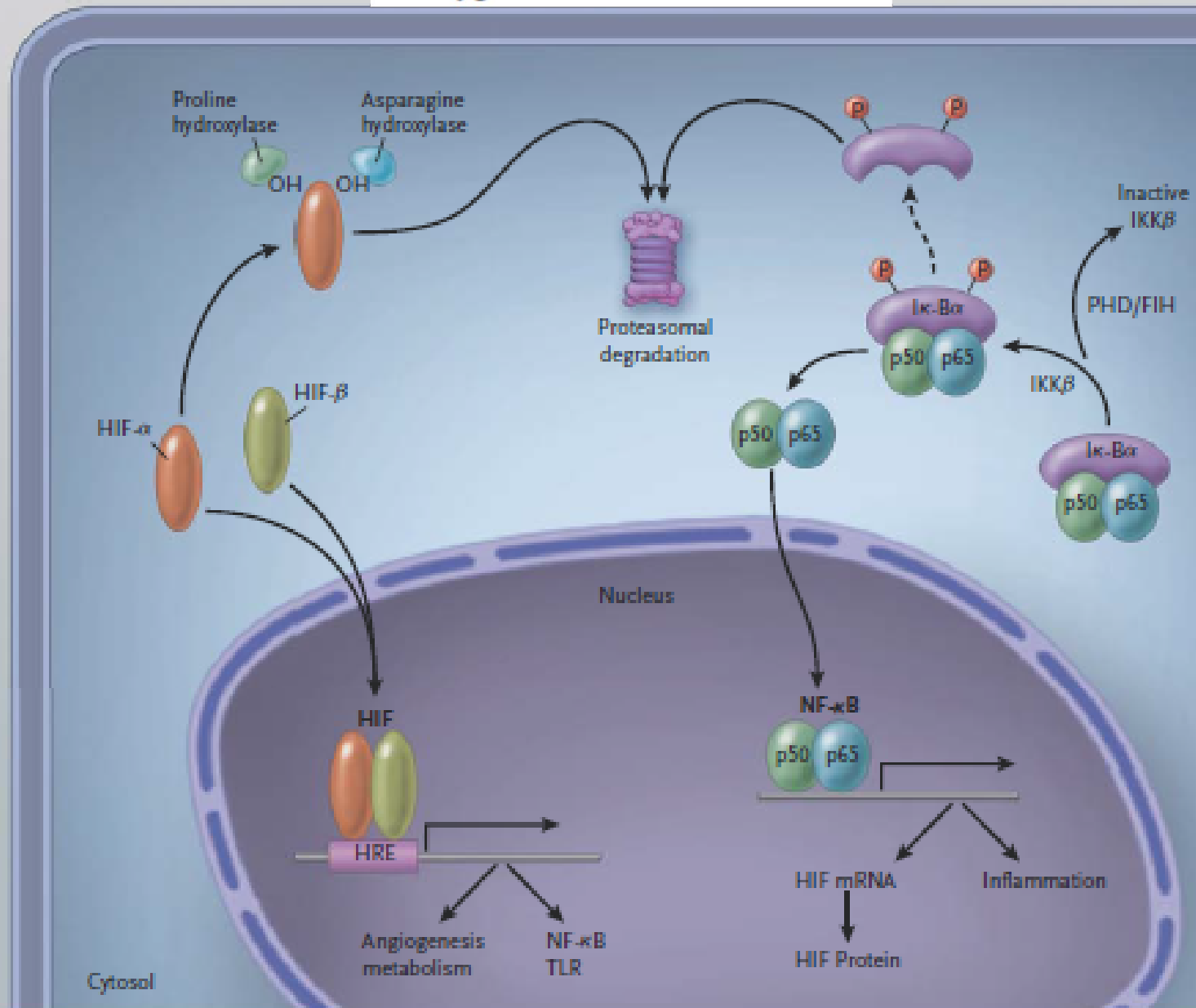
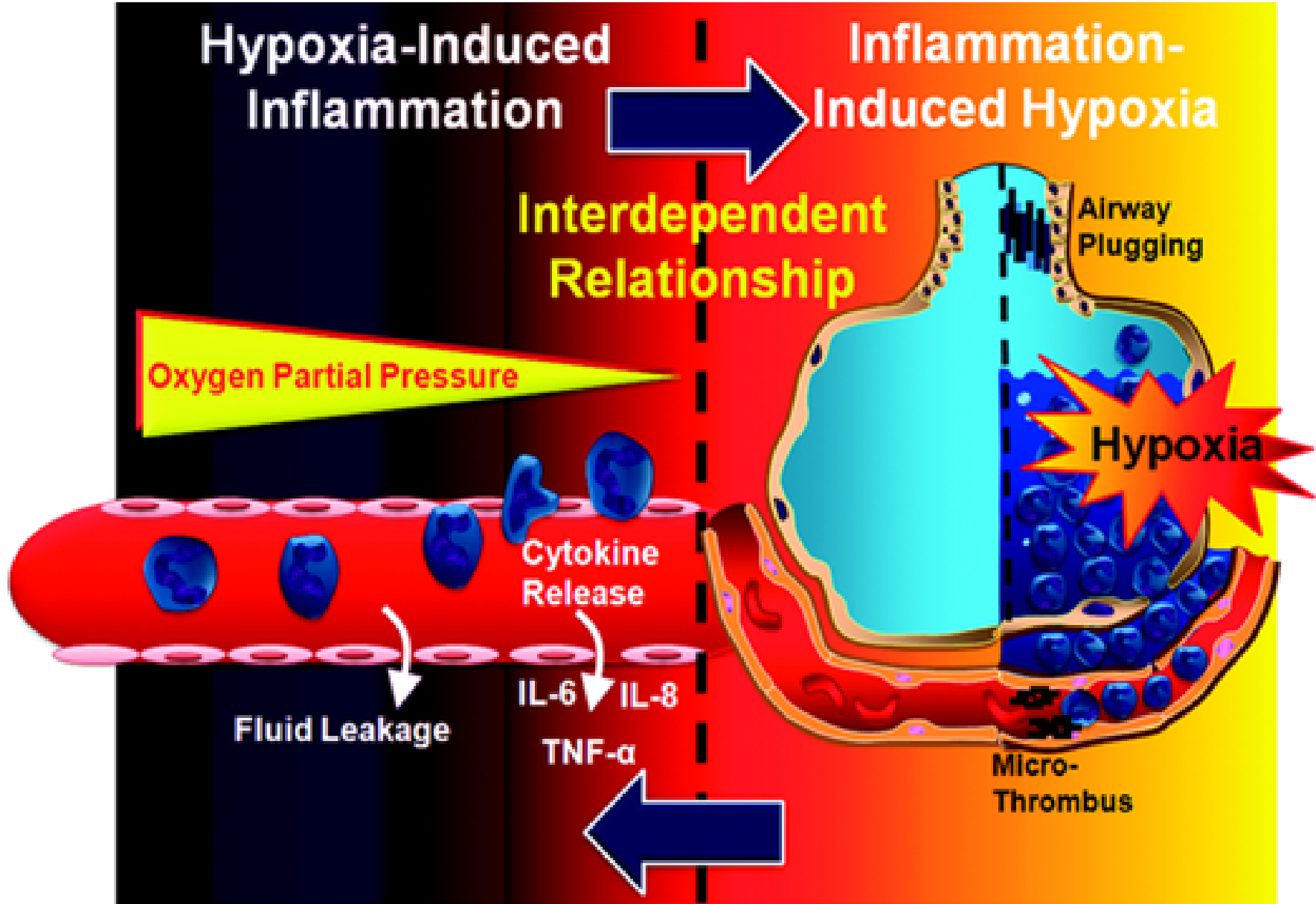
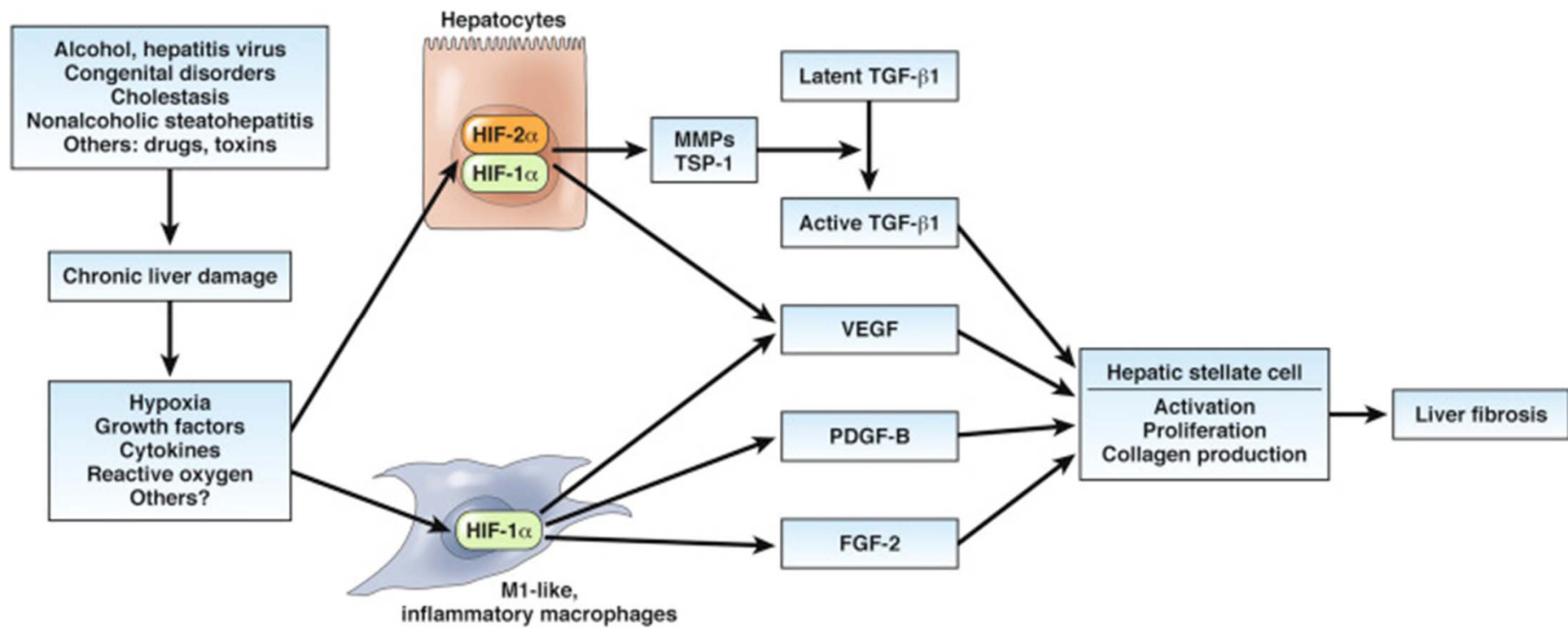
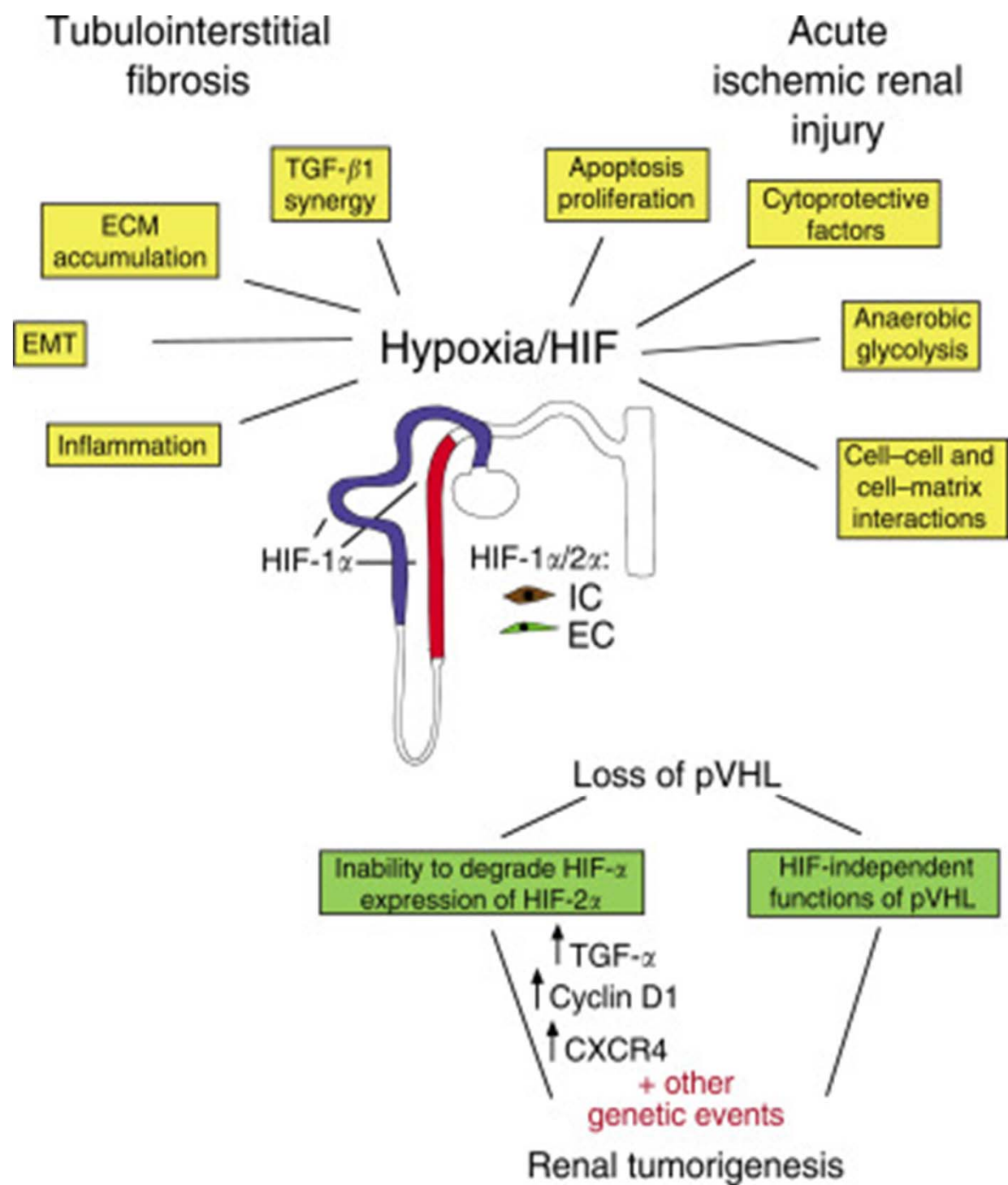


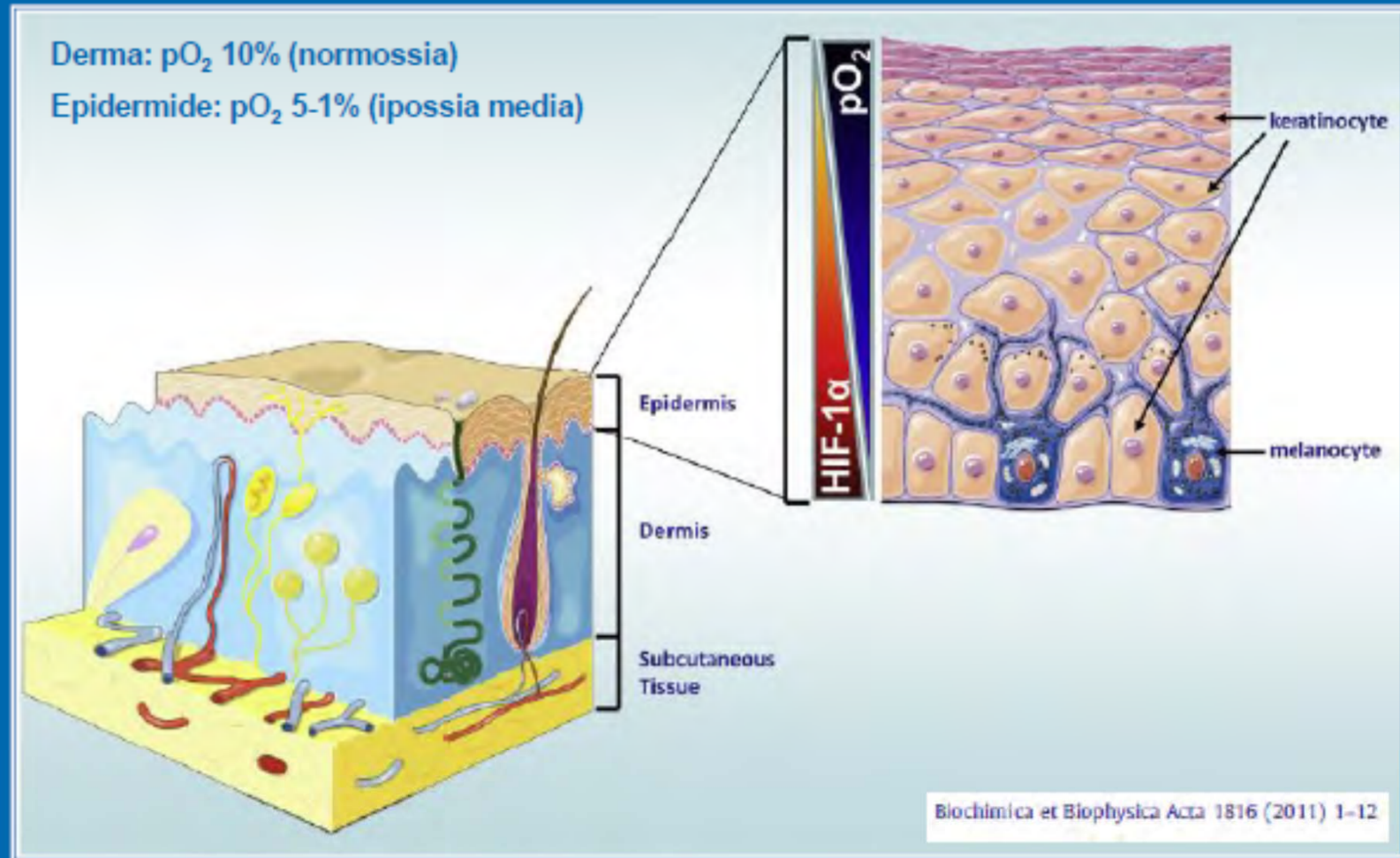
Figure 2. Schematic Overview of the Molecular Interaction between the HIF and (Canonical) NF-κB Pathways.







FATTORE IPOSSICO HIF-1 NELLA CUTE



A mano a mano che si riduce la concentrazione di O_2 nell'epidermide aumenta l'espressione di HIF-1.

L'IP OSSIA FAVORISCE LA TRASFORMAZIONE DEI MELANOCITI E LA CRESCITA TUMORALE

Biochimica et Biophysica Acta 1816 (2011) 1–12

Review

Uncovering the role of hypoxia inducible factor-1 α in skin carcinogenesis

Kris Nys, Hannelore Maes, Aleksandra Maria Dudek, Patrizia Agostinis*

Cell Death Research & Therapy laboratory, Department Molecular and Cell Biology, Faculty of Medicine, Catholic University of Leuven, Herestraat 49, box 901, B-3000, Belgium

HIF-1

```
graph TD; HIF1[HIF-1] --> Chaperatinociti[CHERATINOCITI]; HIF1 --> Melanociti[MELANOCITI]; Chaperatinociti --> Protezione[Protezione dell'integrità del DNA e induzione di apoptosi in seguito a UVB.]; Melanociti --> Stimolazione[Stimolazione della trasformazione maligna in condizioni di media ipossia.]; Protezione --> Omeostasi[OMEOSTASI DELL'EPIDERMIDE]; Stimolazione --> Tumore[TUMORE CUTANEO (MELANOMA)];
```

CHERATINOCITI

Protezione dell'integrità del DNA e induzione di apoptosi in seguito a UVB.

OMEOSTASI DELL'EPIDERMIDE

MELANOCITI

Stimolazione della trasformazione maligna in condizioni di media ipossia.

TUMORE CUTANEO (MELANOMA)

Karolinska Institutet Stockholm

2019 Nobel Prize in Physiology or Medicine

Gregg L. Semenza Sir Peter J. Ratcliffe and William G. Kaelin, Jr.,

for their discoveries of how cells sense and adapt to oxygen availability



OSSIGENO E PROCESSI TUMORALI



“La causa primaria del cancro è la sostituzione della normale respirazione cellulare basata sull'ossigeno con la respirazione anaerobia”

Otto Warburg, premio Nobel per la biochimica nel 1931, maestro insigne di Krebs , altro grande Nobel per la Medicina e Fisiologia (scopritore del ciclo di Krebs – respirazione cellulare)

Effects of hypoxia

Hypoxia

Anti-proliferative effects

- Restrained proliferation
- Differentiation
- Apoptosis
- Necrosis

Normal cells and the majority of cancer cells

"positive" effects



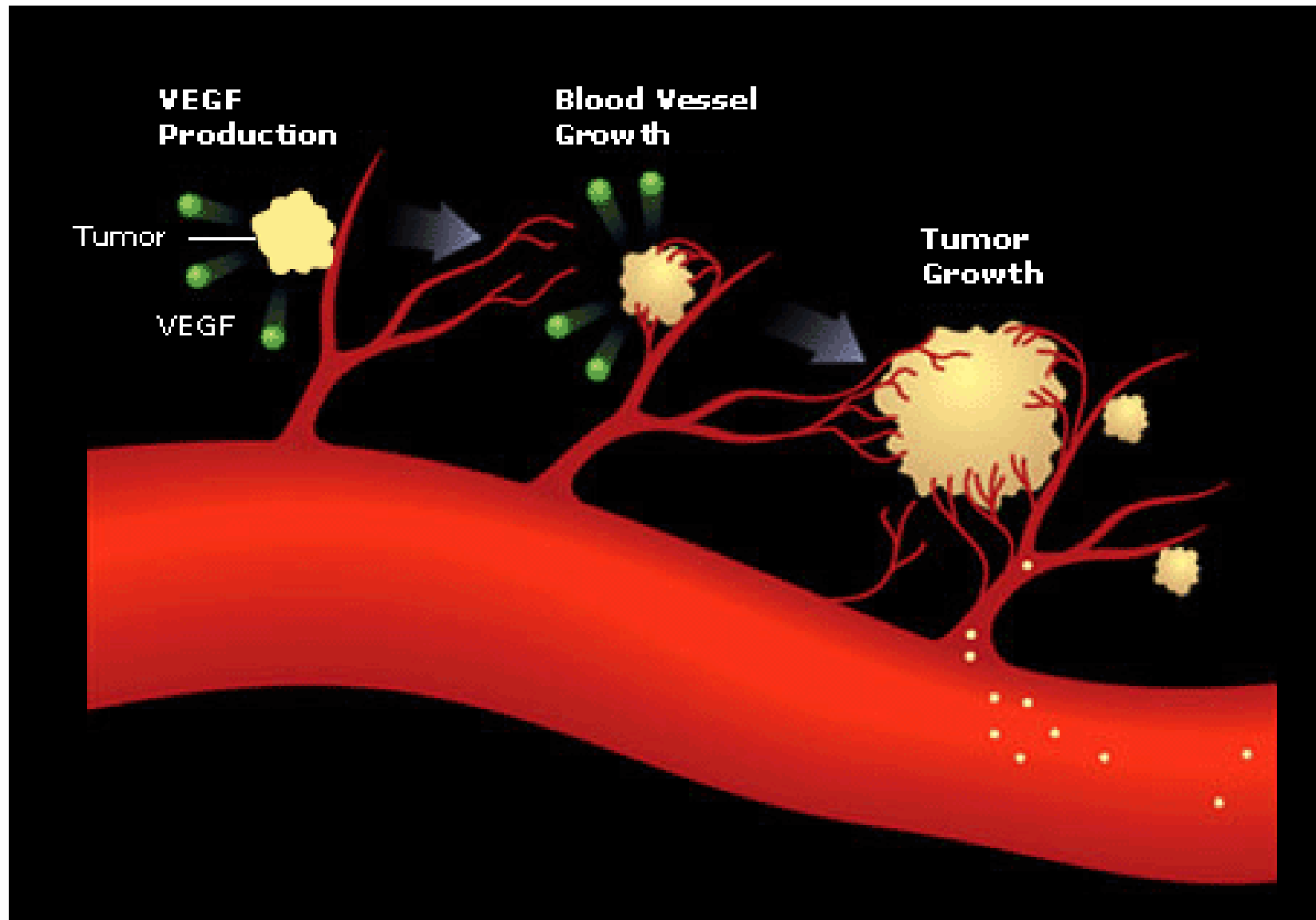
Pro-proliferative effects

- Adaptive processes
- Aggressive phenotype
- Tumour progression
- Acquired treatment resistance

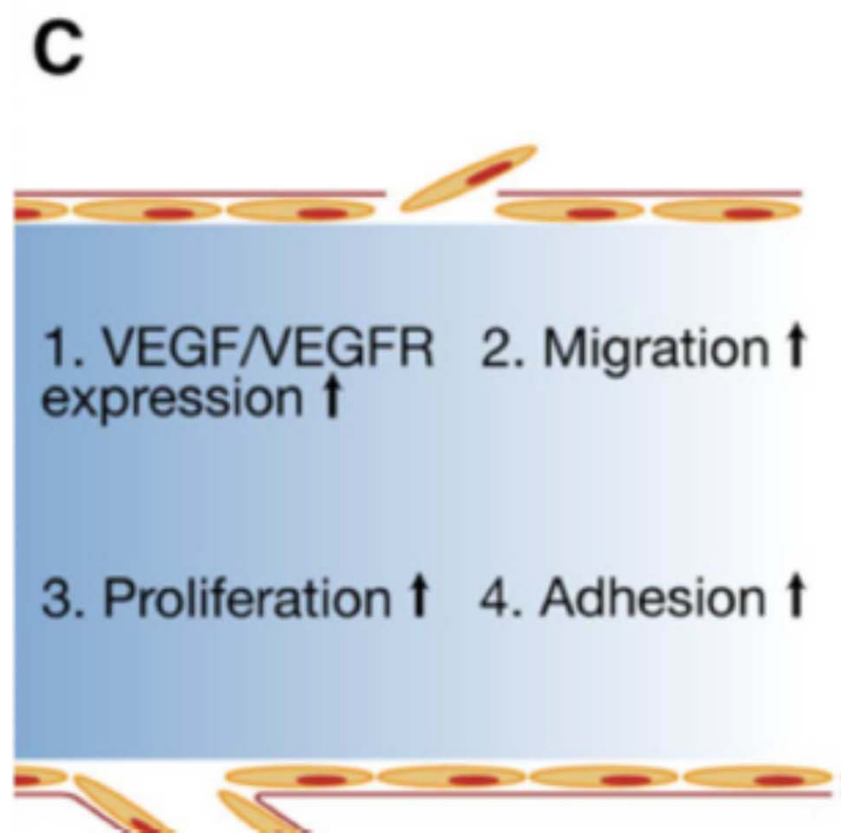
Only a minority of cancer cells but decisive for prognosis

"negative" effects

Angiogenesis



Vascular Responses to HIF: Endothelial Cells (Ecs)



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

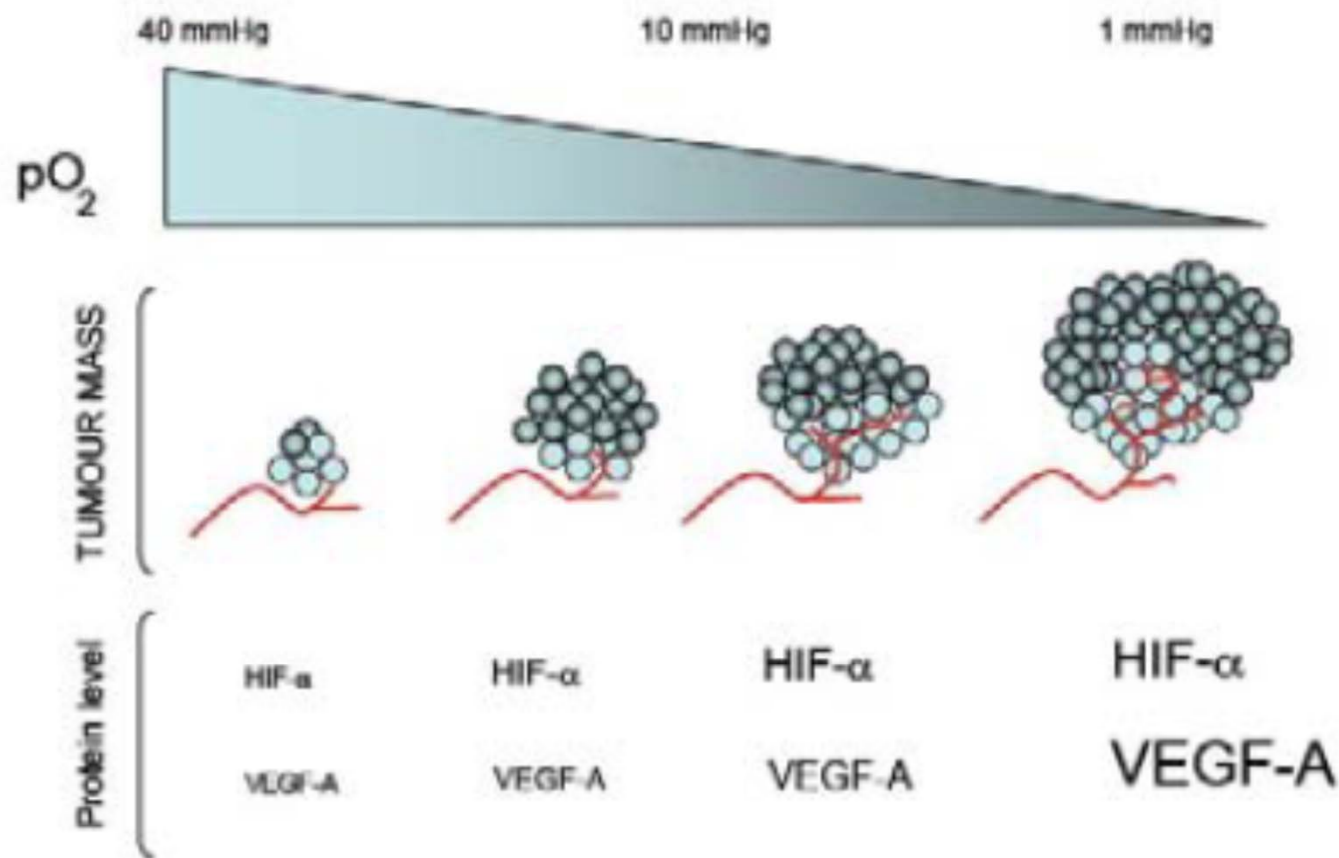
L'ipossia è una condizione diffusa nei tumori

- Molti tumori umani hanno valori di pO_2 bassi
- Una ipossia severa non è normalmente presente in tessuti normali, ma esiste molto spesso nei tumori
- La capacità di adattarsi all'ipossia è essenziale per la crescita tumorale

➤ HIF-1 α Correlates with Tumor Vascularity

- Low oxygen tension is associated with increased metastasis and decreased survival of patients
- The expression of HIF-1 α is positively correlated with tumor vascularity.

Zagzag D. (2000) *Cancer*. 88:2606



HIF = Hypoxia-Inducible Factor
 VEGF-A = Vascular Endothelial Growth Factor-A

La riduzione della concentrazione di O_2 nella cellula tumorale (IPOSSIA) promuove l'espressione del fattore ipossico **HIF-1 α** .

LA METILAZIONE DEL DNA

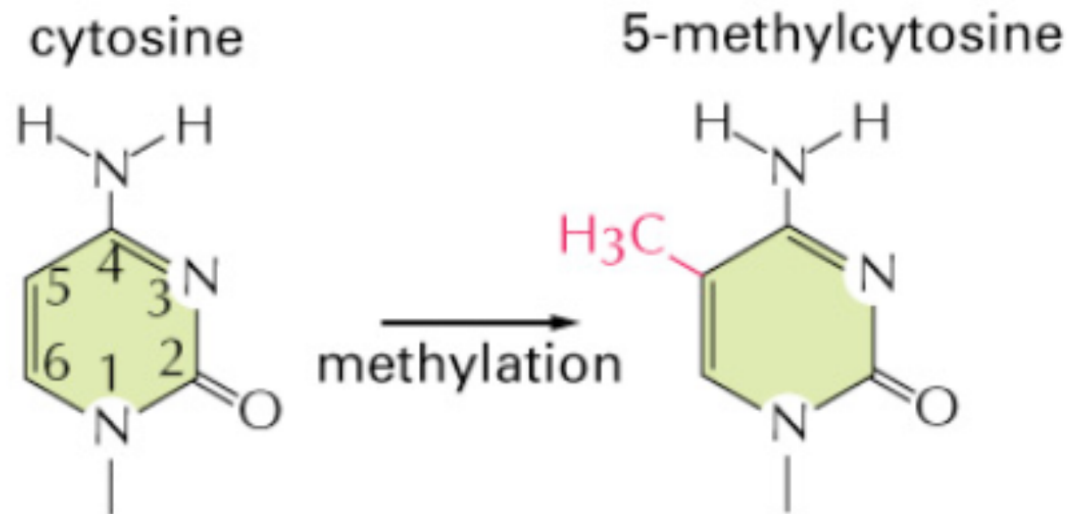
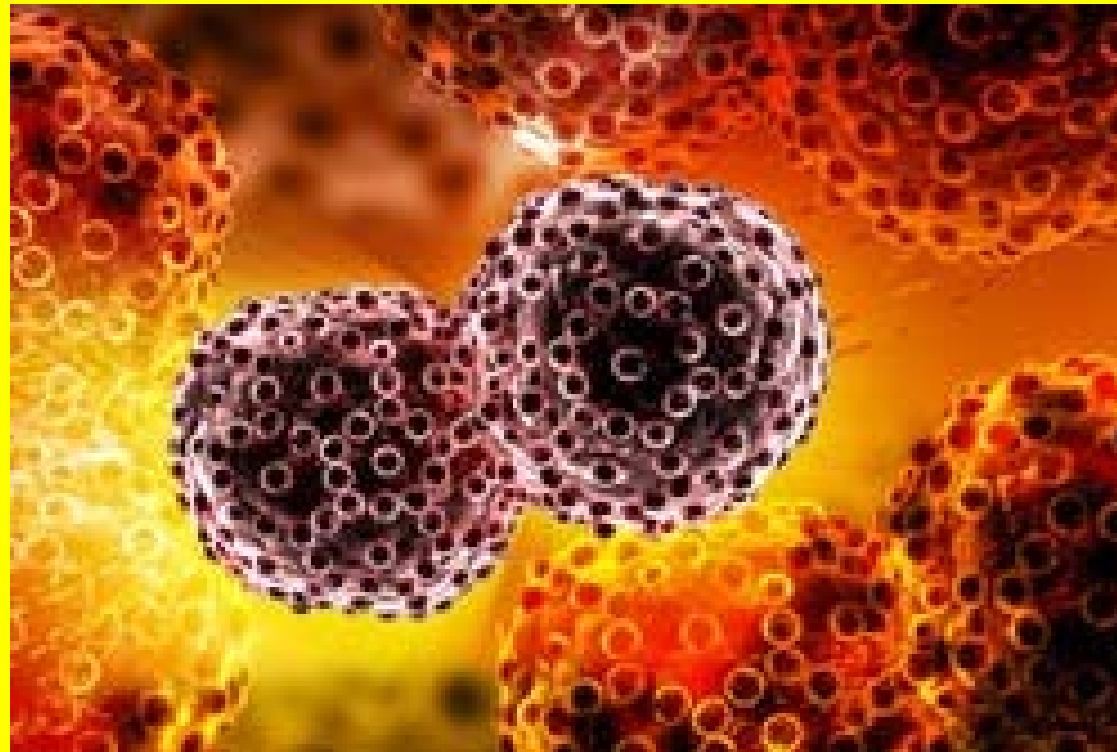


Figure 7-80. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

- Modificazione postreplicativa del genoma catalizzata dalle DNA metiltransferasi.
- Nei vertebrati interessa solo le citosine appartenenti ai dinucleotidi CpG.

Tumor hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity

Nature. 2016 September 01; 537(7618): 63–68.



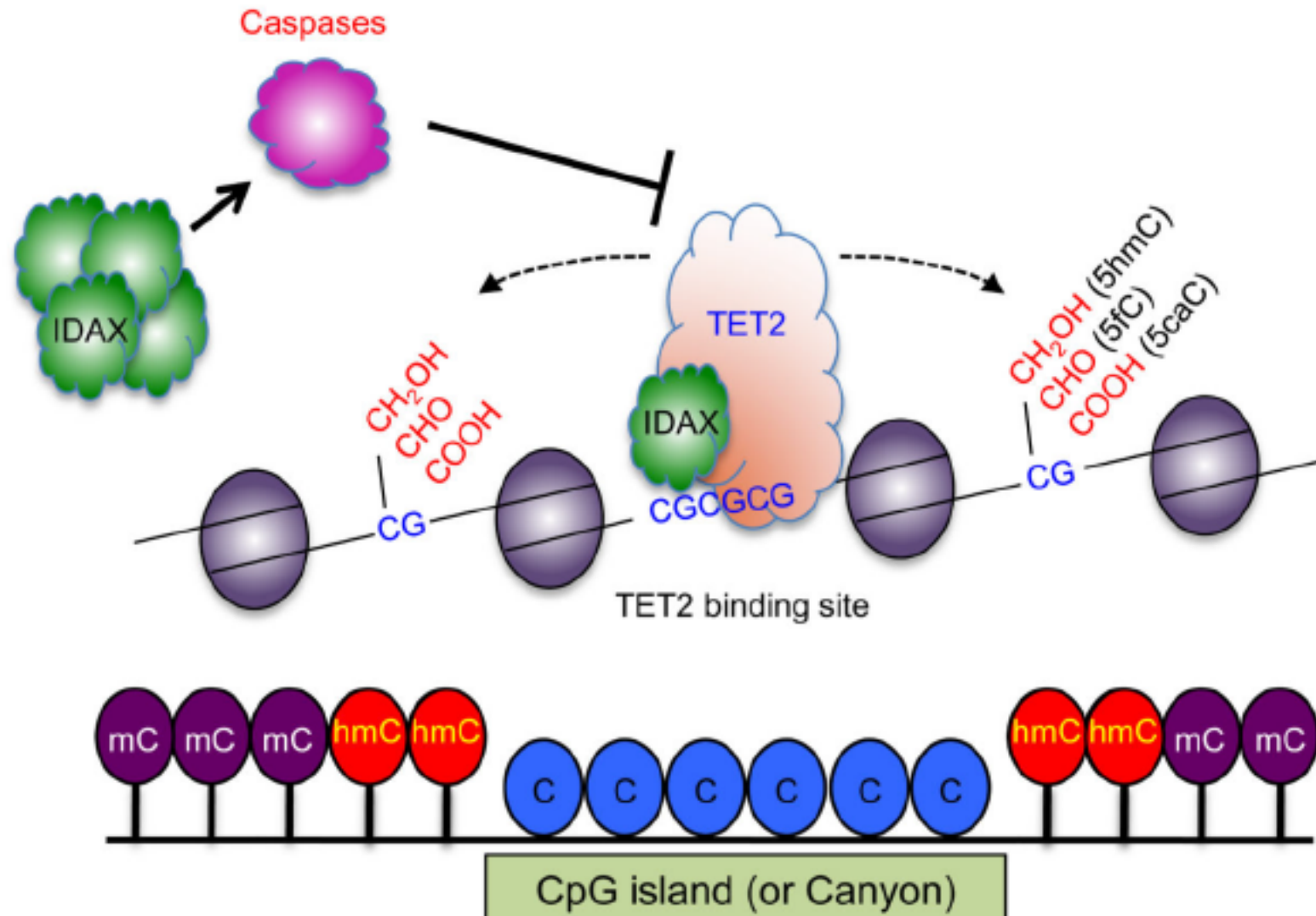
Hypoxia and Epigenetic Modifications

Modifiche epigenetiche come la metilazione del DNA sono fondamentali per la regolazione della trascrizione genica e influenzano la stabilità del genoma e lo sviluppo. Gli enzimi responsabili della demetilazione del DNA sono stati identificati solo pochi anni fa e appartengono alla **famiglia di enzimi di traslocazione dieci-undici (TET) in grado di ossidare la 5-metilcitosina** ha notevolmente migliorato la nostra comprensione della demetilazione del DNA.

Nel cancro, la metilazione del DNA è disregolata e l'iper-metilazione dei promotori dei geni soppressori del tumore conferisce vantaggi di crescita alle cellule tumorali.

La conversione della 5-metilcitosina in 5-idrossimetilcitosina da parte degli enzimi TET richiede ossigeno mentre l'ipossia è comune nel cancro, suggerendo un potenziale effetto sinergico.

Inoltre, l'ipossia induce l'attività dei fattori di trascrizione HIF, che alterano l'espressione genica nelle cellule per far fronte all'ipossia.



(A) TET proteins control DNA methylation-demethylation dynamics. DNA methyltransferases (DNMTs) add a methyl group to the 5 position of cytosine in the context of CpG dinucleotides to produce 5-methylcytosine (5mC). TET proteins are Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenases that successively oxidize 5mC to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), 5-formylcytosine (5fC) and 5-carboxylcytosine (5caC). 5mC and all its oxidized derivatives (ox-mCs) are passively diluted and converted into cytosines when maintenance methylation is blocked during DNA replication (*dashed lines*).

Riassunto del rapporto finale – CHAMELEO

L'ipossia cellulare altera la metilazione del DNA attraverso la perdita dell'ossidazione dell'epigenoma

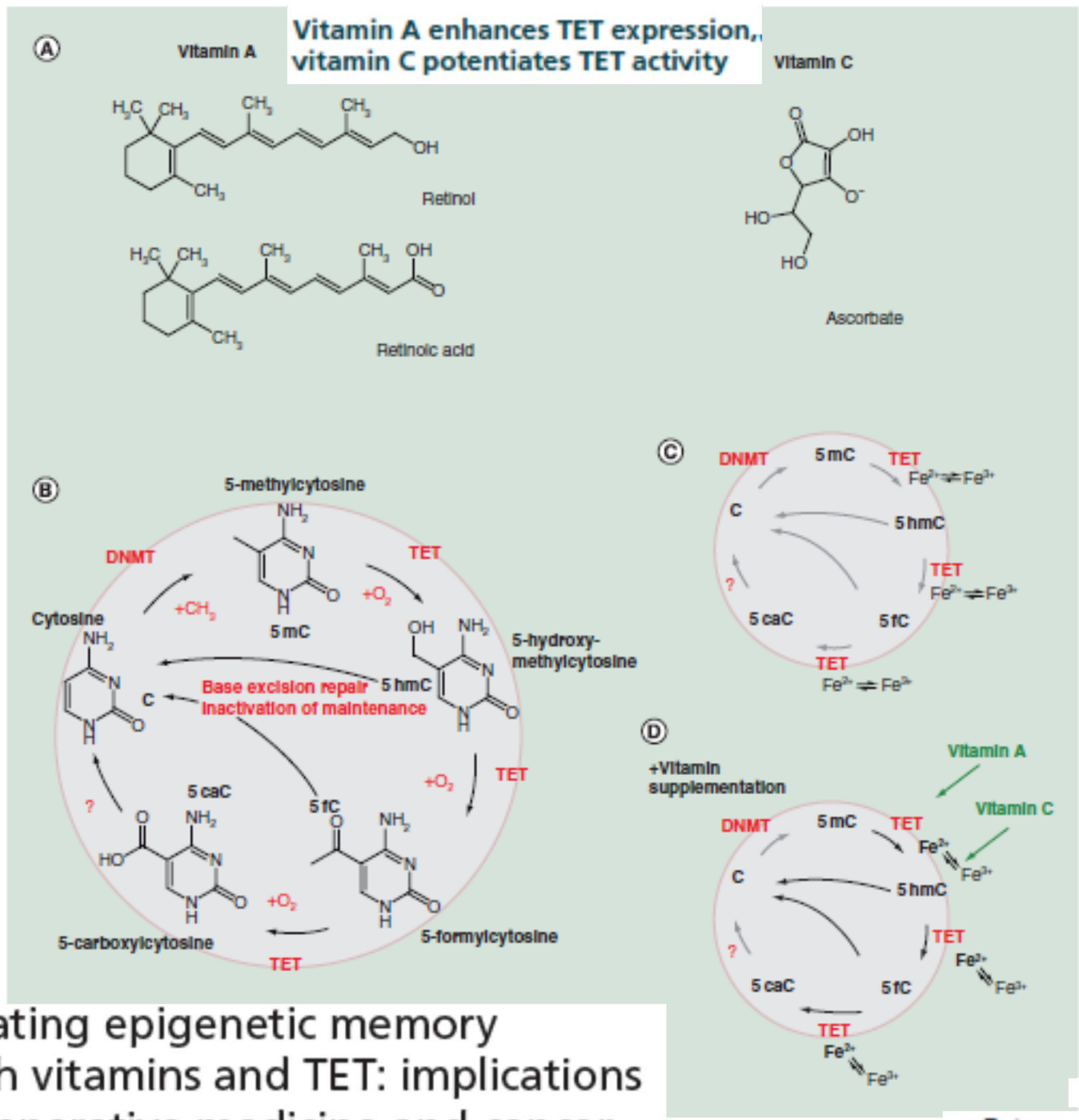
L'ipermetilazione dei promotori del gene del soppressore del tumore (TSG) conferisce benefici di crescita alle cellule tumorali, ma il modo in cui questi cambiamenti si presentano è stato finora scarsamente compreso.

Con lo studio CHAMALEO viene dimostrato che **l'ipossia tumorale riduce l'attività degli enzimi TET ossigeno-dipendenti, che catalizzano la demetilazione del DNA attraverso l'ossidazione della 5-metilcitosina.**

Ciò si verifica indipendentemente dalle alterazioni associate all'ipossia nell'espressione del gene TET, metabolismo basale, attività HIF o specie reattive dell'ossigeno a livello nucleare, **ma dipende direttamente dalla carenza di ossigeno.**

La perdita di attività dei TET dipendeva unicamente dalla carenza di ossigeno e ha aumentato l'ipermetilazione dei promotori genetici.

L'ipossia del tumore agisce quindi come un nuovo regolatore alla base della metilazione del DNA



Modulating epigenetic memory through vitamins and TET: implications for regenerative medicine and cancer

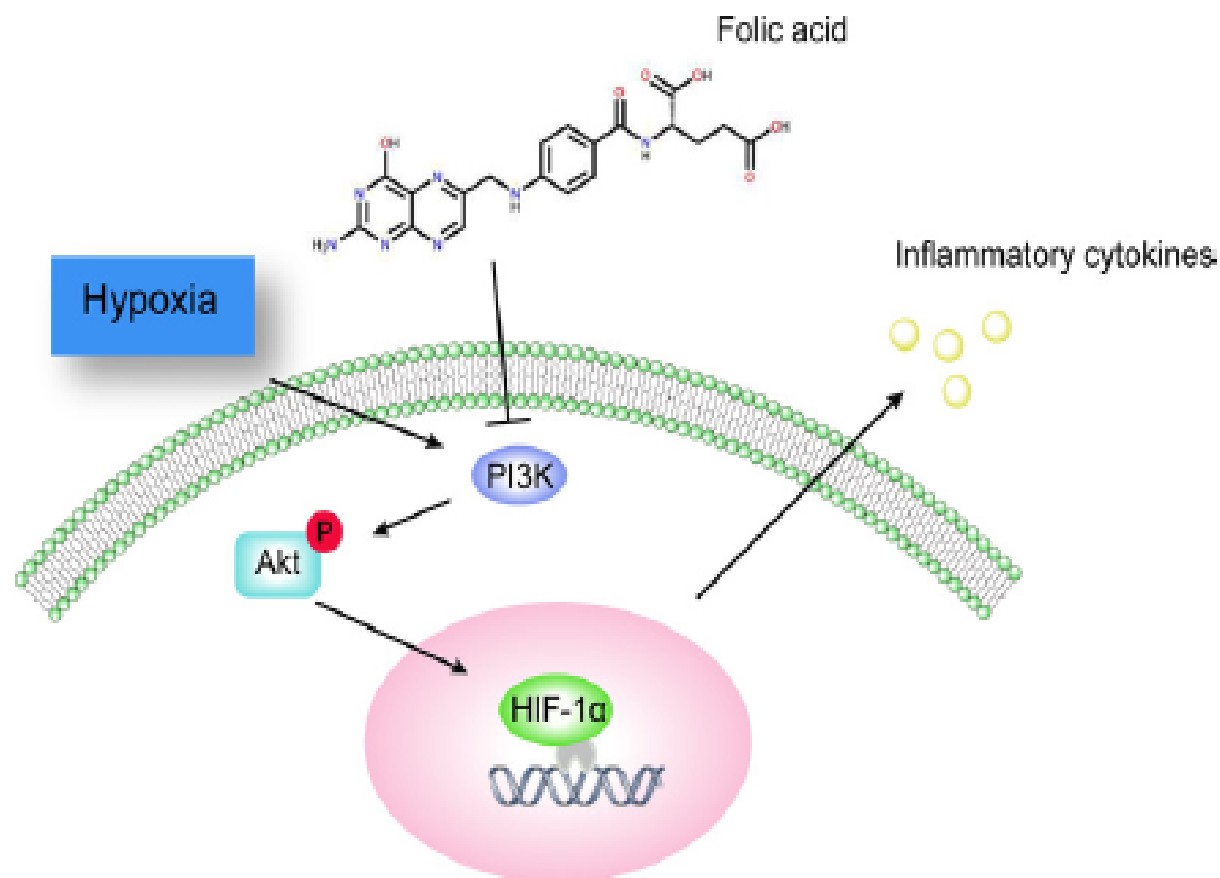


Fig 5. Schematic model of the possible mechanism of inflammatory cytokines down-regulation by folic acid. Folic acid represses inflammatory cytokine secretion and mRNA expression by inhibiting the PI3K/Akt/HIF-1 α pathway under hypoxic conditions.

MODULATORI FISIOLÓGICI DELL'OSSIGENO A BASE DI DEUTROSULFAZYME (CELLFOOD)

Integratori nutrizionali naturali (dall'alga marina *Lithothamnion calcareum*) contenenti dispersi in forma colloidale amminoacidi, enzimi, oligoelementi e solfato di deuterio attivato in tracce.

Nuova classe di nutraceutici mirati a **modulare l'ossigeno a livello cellulare**, in modo da trarre tutti i possibili benefici dall'ossigenazione cellulare senza intercorrere nei processi ossidativi ad essa legati.

Aumento della respirazione
mitocondriale e della
produzione di ATP.

Elevata azione protettiva
antiossidante contro i danni
cellulari causati dai ROS.

Riduzione dell'espressione del
fattore ipossico HIF1.

Deutrosulfazyme in Hypoxia-induced Ros and Respiratory Metabolism

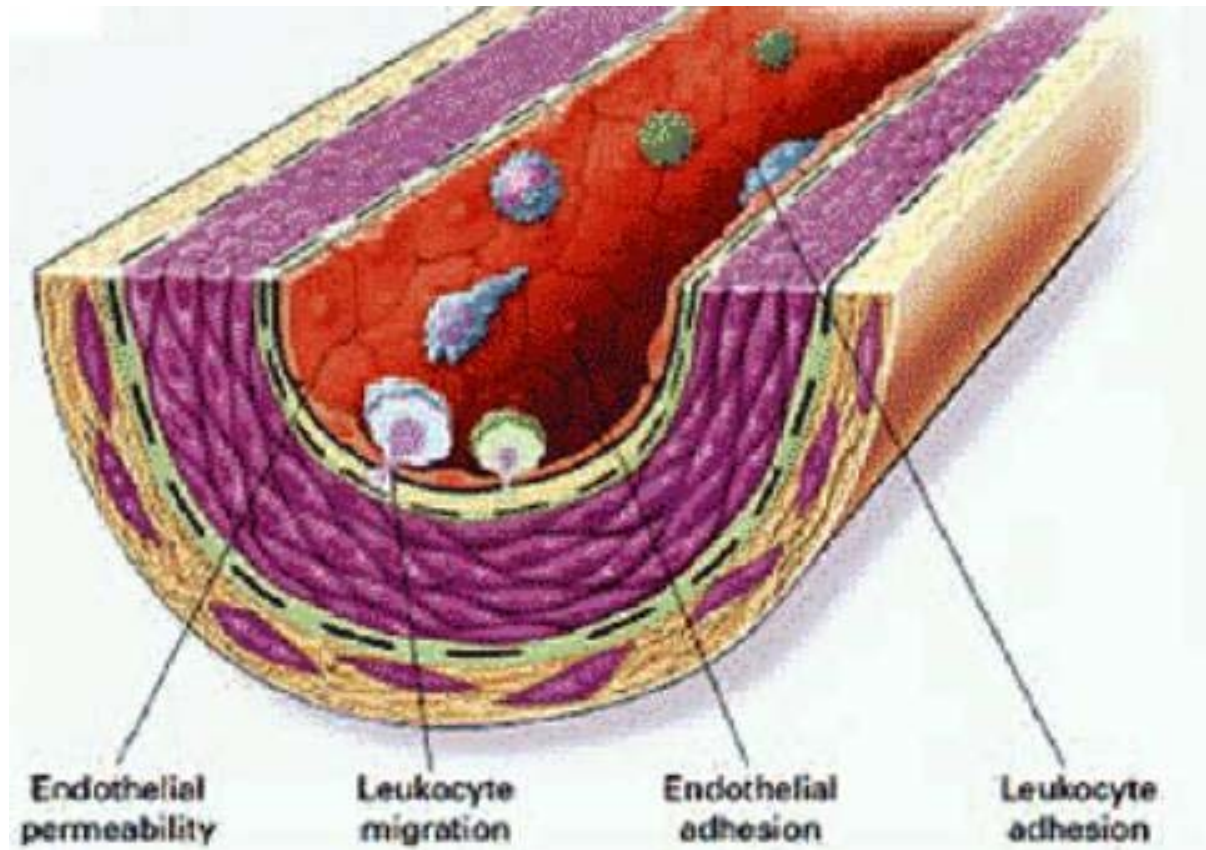
E. FERRERO¹, A. FULGENZI², D. BELLONI¹, C. FOGLIENI³, M.E. FERRERO²

CELLFOOD™ IMPROVES RESPIRATORY METABOLISM OF ENDOTHELIAL CELLS AND INHIBITS HYPOXIA-INDUCED ROS GENERATION

¹Myeloma Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; ²Dipartimento di Morfologia Umana e Scienze Biomediche - Citta Studi, Universita degli Studi di Milano, Milan, Italy; ³Clinical Cardiovascular Biology Laboratory, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

Endothelial mitochondria, the major site of ATP generation, modulate the intracellular dynamics of Reactive oxygen species (ROS), which, in turn, control endothelial function. Adequate oxygen (O₂) supply is required by endothelial cells (EC). Both hypoxia and hyperoxia may favor the overproduction of ROS leading to oxidative stress, mitochondrial damage and endothelial dysfunction. We investigated the capability and mechanisms of Cellfood™ (CF), an antioxidant compound, to modulate O₂ availability and mitochondrial respiratory metabolism and to regulate ROS generated by hypoxia in EC *in vitro*. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and ECV-304 were evaluated for the O₂ consumption using a Clark's electrode. O₂ consumption rate rose, during the first minutes after CF addition and was associated with increase in mitochondrial oxidative capacity and good cell viability. Similar behaviours were observed when EC were exposed to CF for up to 8 days. O₂ consumption increased and was accompanied by both intracellular rise of ATP and maintainment of LDH concentration. Hypoxia-induced ROS generation was significantly inhibited by CF, through the up-regulated expression of MnSOD, an anti-oxidant responsible for mitochondrial function preservation. The EC hypoxic response is mediated by the hypoxia master regulator HIF-1α whose activation was attenuated by CF, in concomitance with MnSOD up-regulation. Our results suggest a role for CF in improving respiratory metabolism and in activating anti-oxidant mechanisms in EC, thus preserving endothelial function.

Key words: *Cellfood™, human umbilical vein endothelial cells, hypoxia inducible factor-1alpha, mitochondrial activity, reactive oxygen species generation, MnSOD*



Endotelio vascolare organo cruciale

The O₂ consumption increased and was accompanied by both intracellular **rise of ATP and maintainement of LDH concentration in endothelial human cell lines.**

Hypoxia-induced ROS generation was significantly inhibited by CF, through the up-regulated expression of MnSOD, an anti-oxidant responsible for mitochondrial function preservation.

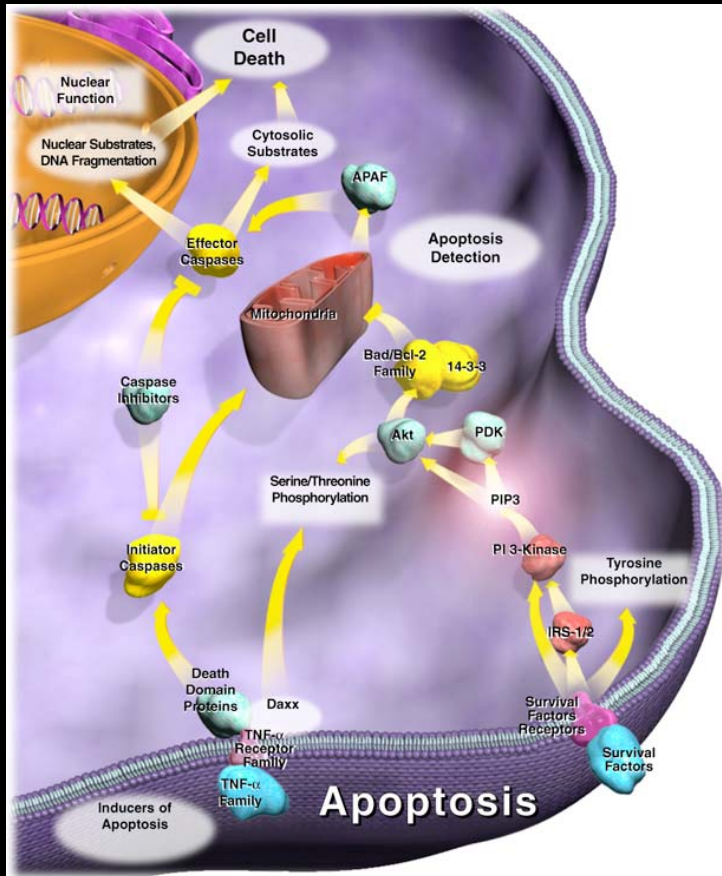
The EC hypoxic response is mediated by the hypoxia master regulator HIF-1alpha whose activation was attenuated by CF, in concomitance with MnSOD up-regulation.

Our results suggest a role for CF in improving respiratory metabolism and in activating anti-oxidant mechanisms in EC, thus preserving endothelial function.

Studio Sperimentale

Lab Oncologia Regina Elena

VALUTAZIONI BIOCHIMICHE



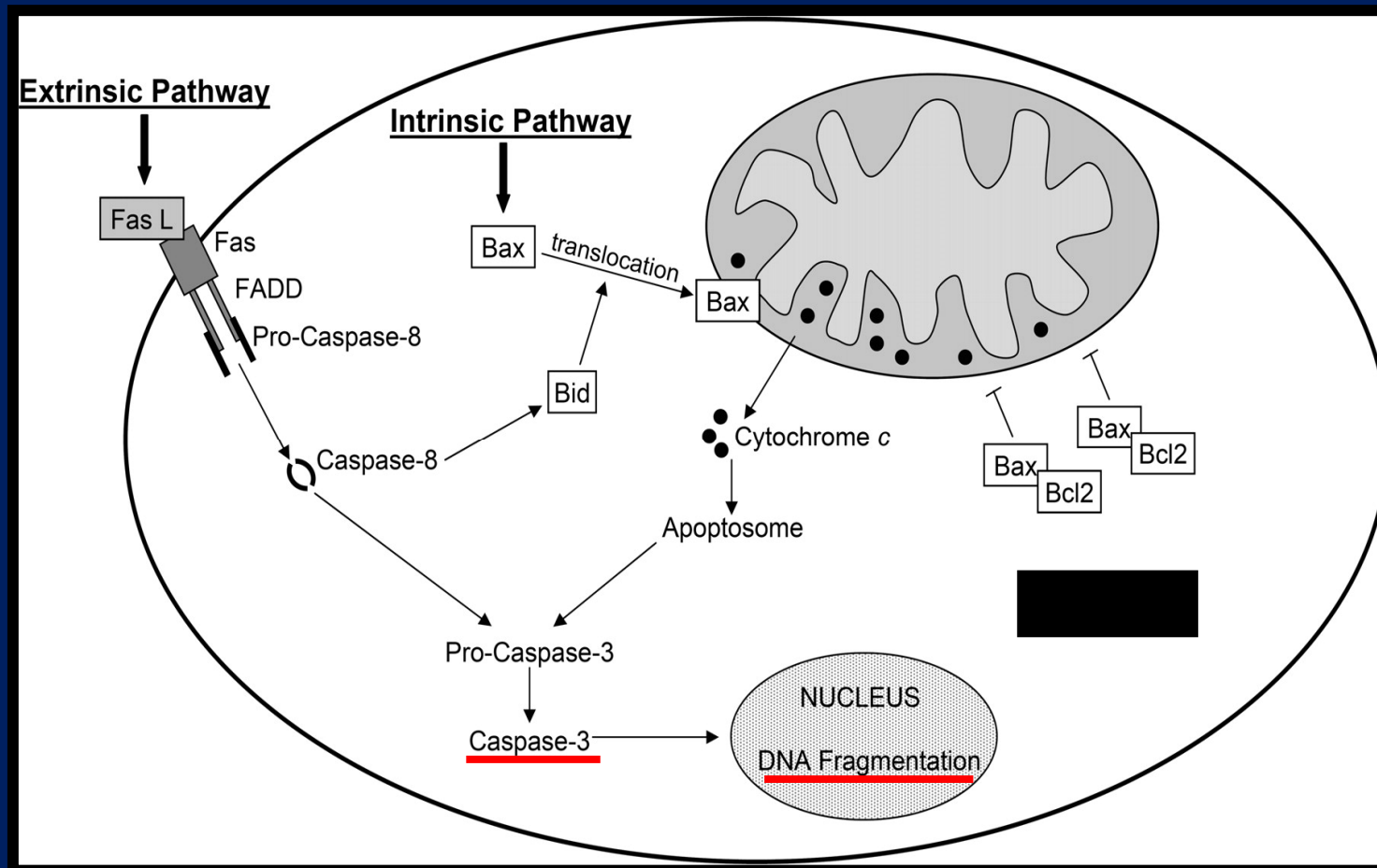
PROLIFERAZIONE CELLULARE

APOPTOSI

HIF-1 α

METABOLISMO CELLULARE

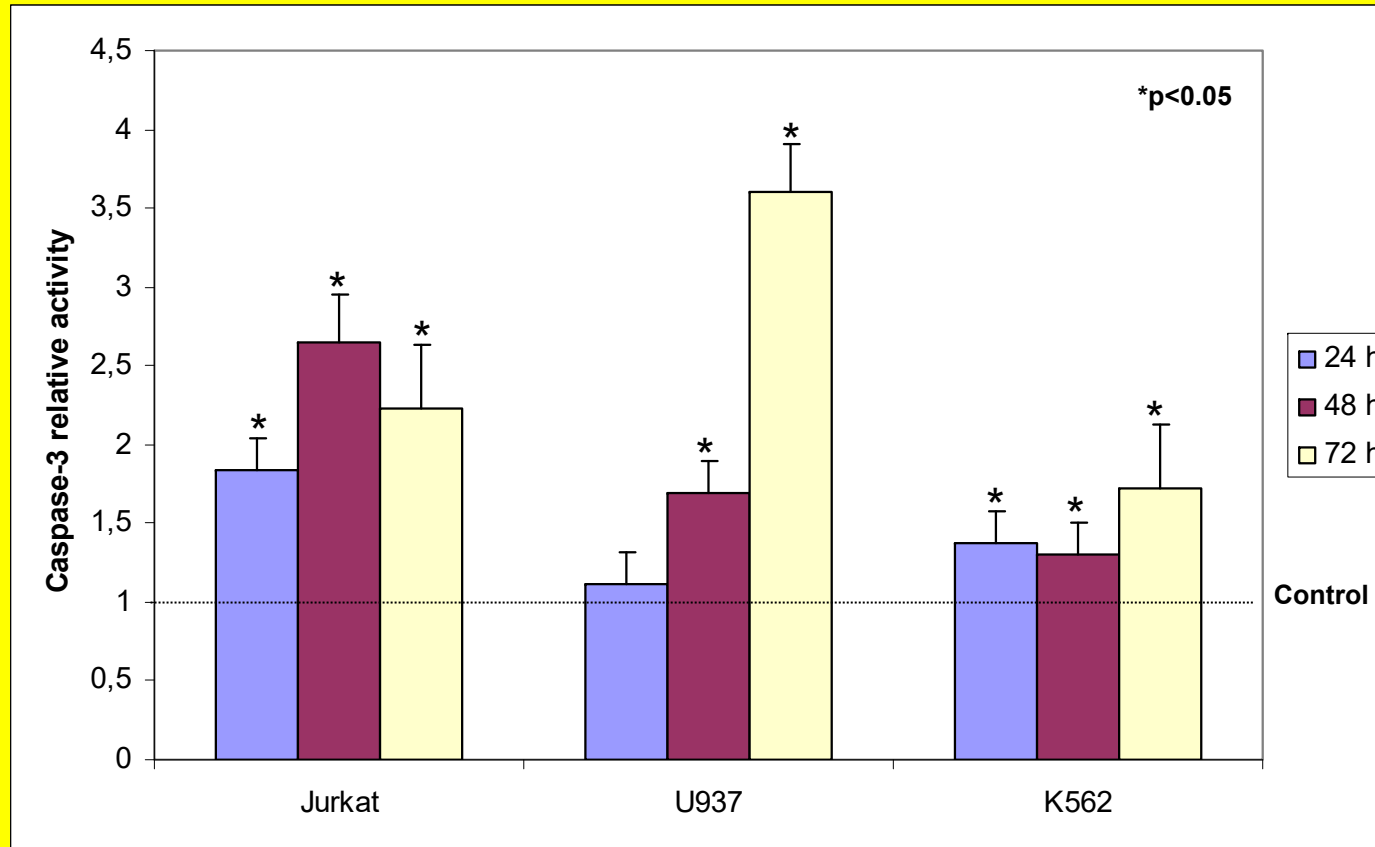
MECCANISMO APOPTOTICO



Valutazione attivazione caspasi-3 e frammentazione DNA nucleare.

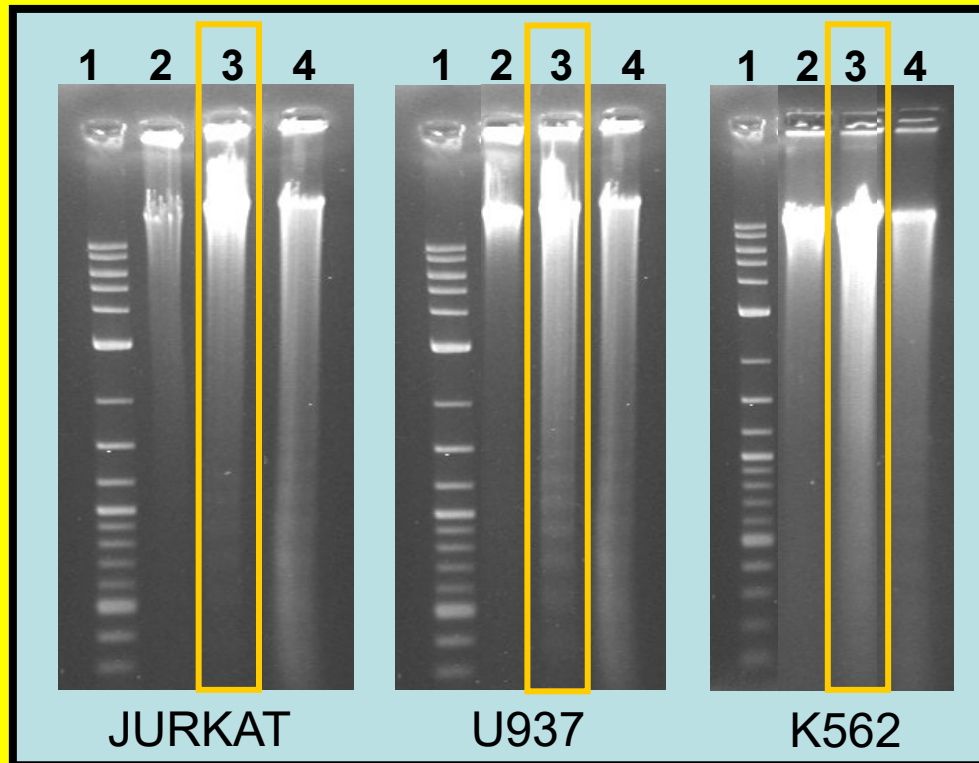
RISULTATI: APOPTOSI

DEUTROSULFAZYME attiva in maniera significativa la proteina pro-apoptotica caspasi-3 rispetto alle cellule di controllo (non trattate).



RISULTATI: APOPTOSI

DEUTROSULFAZYME promuove la frammentazione del DNA nucleare (laddering).



LEGENDA:

1: DNA standard

2: CTR negativo (cellule non trattate)

3: CF 5 µl/ml

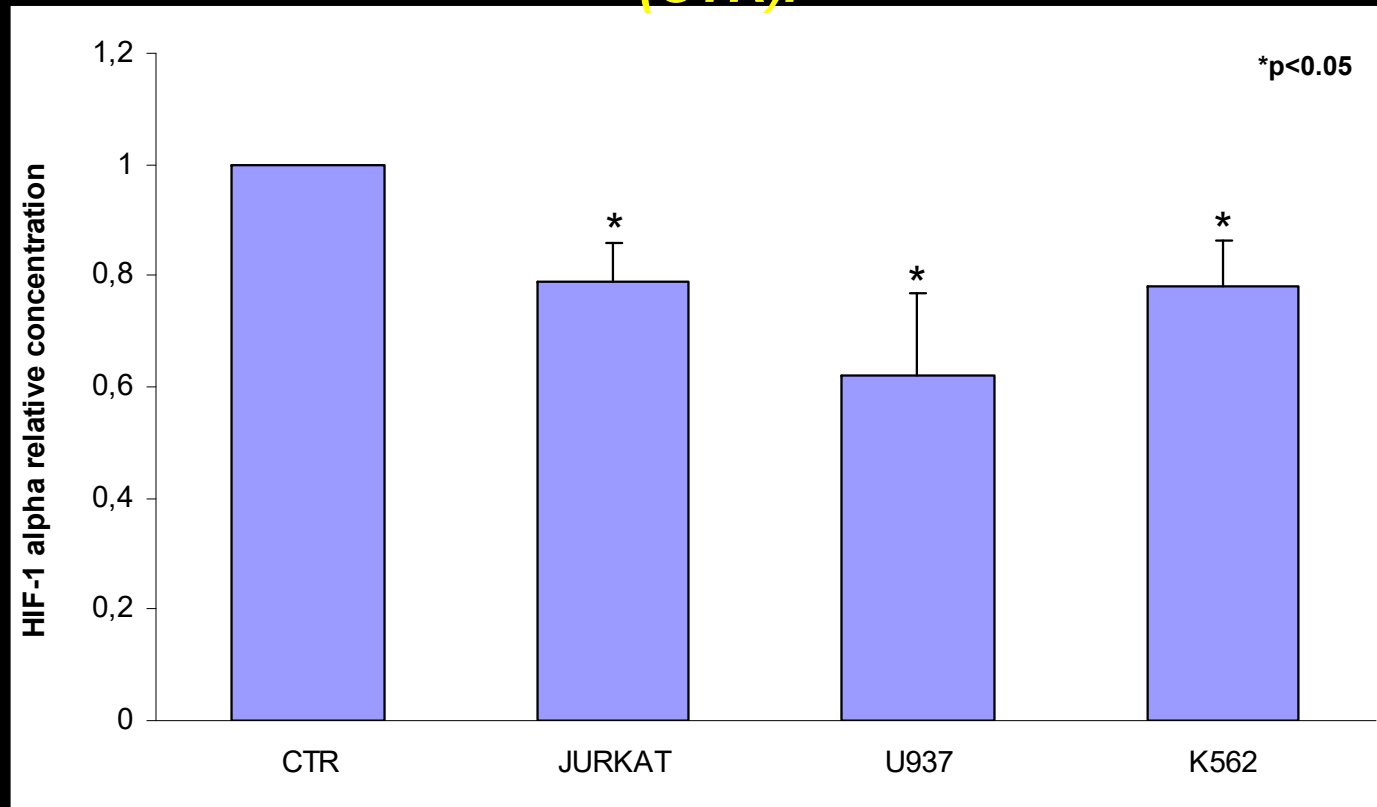
4: CTR positivo (etoposide)

L
I
N
E
E
L
E
U
C
E
M
I
C
H
E

Nelle tre linee leucemiche DEUTROSULFAZYME induce morte cellulare per apoptosi.

RISULTATI: HIF-1 α

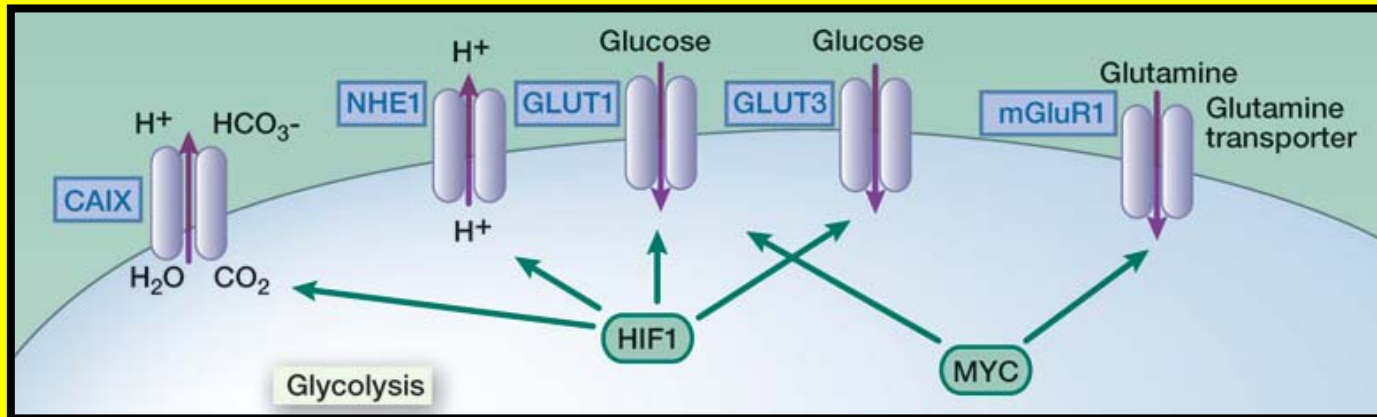
DEUTROSULFAZYME riduce in maniera significativa la concentrazione di HIF-1 α rispetto alle cellule non trattate (CTR).



**SUSCETTIBILITA' ALL' APOPTOSI
LEGATA ALLA RIDUZIONE DI HIF-1 α**

RISULTATI: metabolismo cellulare

HIF-1 promuove l'espressione dei recettori per il glucosio (GLUT).

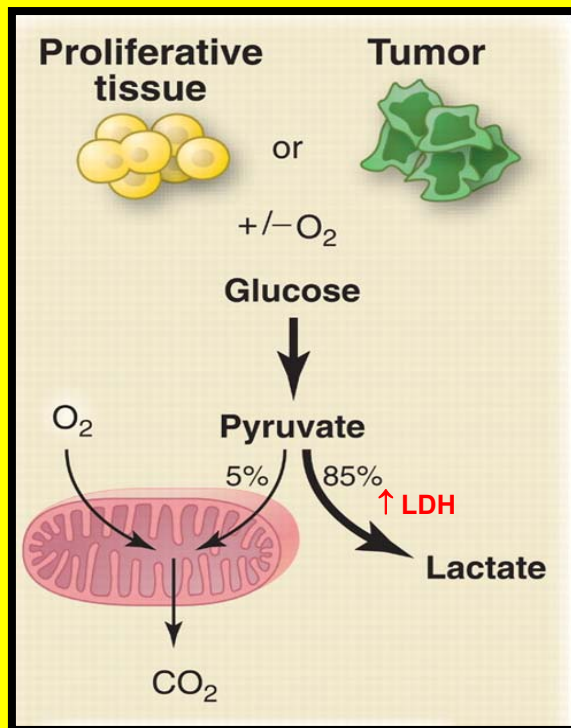


DEUTROSULFAZYME riduce l'espressione del recettore GLUT-1 attraverso la deregolazione di HIF-1 α .

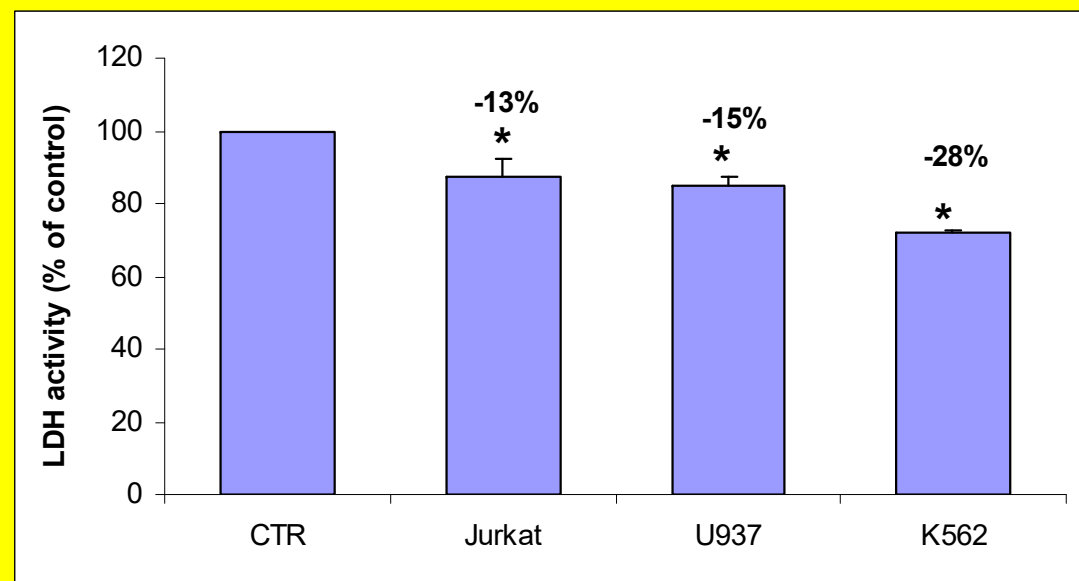
	Jurkat		U937		K562	
	CTR	CF	CTR	CF	CTR	CF
GLUT-1	1	0.83	1	0.29	1	0.68

RISULTATI: metabolismo cellulare

HIF-1 promuove l'aumento dell'attività dell'enzima LDH per la conversione del piruvato in lattato.

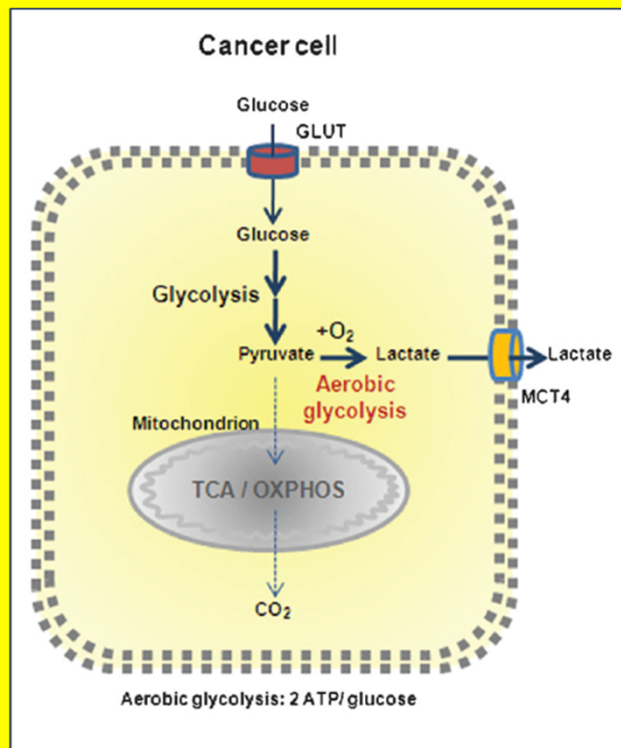


DEUTROSULFAZYME riduce l'attività dell'enzima glicolitico lattato deidrogenasi attraverso la deregolazione di HIF-1 α .

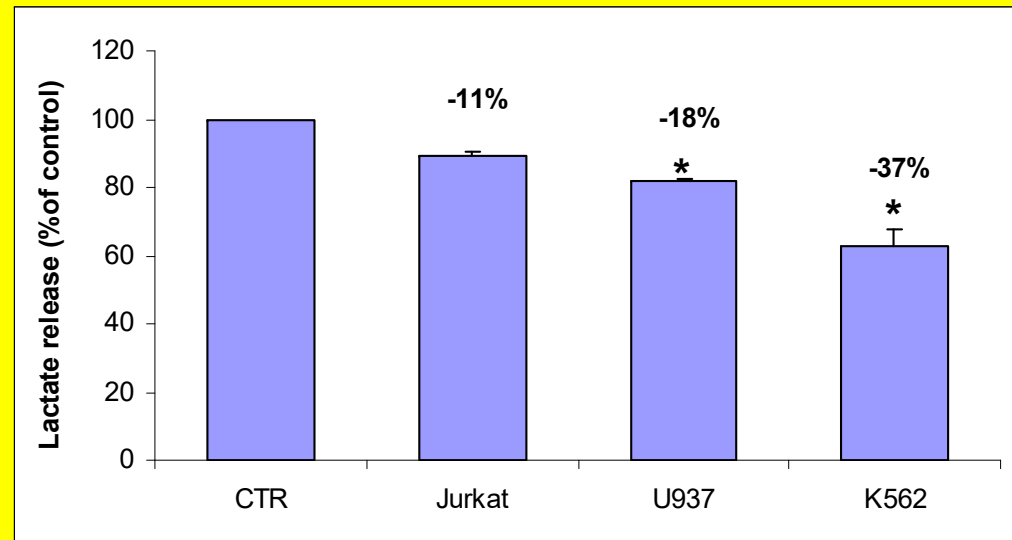


RISULTATI: metabolismo cellulare

Nella cellula tumorale si ha una elevata produzione di lattato ad opera della LDH.



In presenza di DEUTROSULFAZYME si ha una riduzione della produzione intracellulare di lattato.

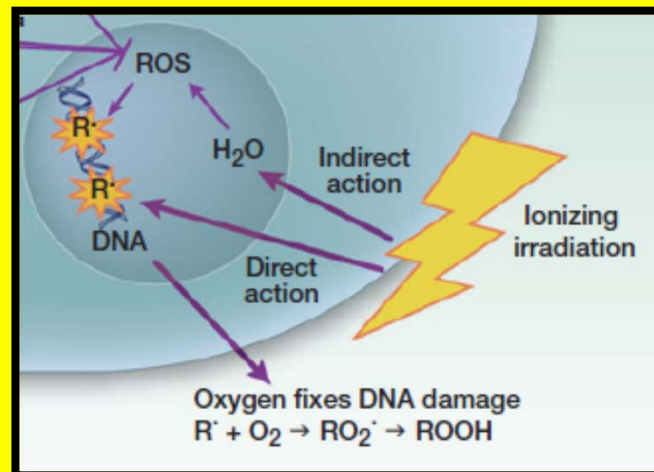


Clin Cancer Res 2012;18:5585-5594.

Targeting Hypoxia, HIF-1, and Tumor Glucose Metabolism to Improve Radiotherapy Efficacy

Tineke W.H. Meijer, Johannes H.A.M. Kaanders, Paul N. Span, and Johan Bussink

Modulando HIF-1 e il metabolismo del glucosio aumenta l'efficacia della radioterapia in quanto il tumore si sensibilizza all'irradiazione.



**IMPORTANZA DEL DEUTROSULFAZYME COME
COADIUVANTE ALLA RADIOTERAPIA**

CONCLUSIONI LINEE LEUCEMICHE

DEUTROSULFAZYME è in grado di inibire la crescita di cellule leucemiche in coltura attraverso l'alterazione del metabolismo cellulare e l'induzione di apoptosi.



Essendo il DEUTROSULFZYME un supplemento nutrizionale contenente diversi principi attivi (solfato di deuterio, minerali, aminoacidi ed enzimi), **gli effetti pro-apoptotici sembrano dipendere maggiormente dall'intera formula piuttosto che da uno o più componenti specifici.**

CONCLUSIONI

I risultati fino ad oggi ottenuti in vitro sulle linee tumorali in coltura suggeriscono che questo supplemento, grazie alle sue proprietà pro-apoptotiche, **DEUTROSULFAZYME** può essere un **nutraceutico di grande utilità clinica sia come supporto al trattamento antineoplastico che come chemopreventivo.**