

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE BIOMEDICHE

CURRICULA GENOMICA-PROTEOMICA/CICLO XXIV

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

MECCANISMI DI REGOLAZIONE DELL'OMEOSTASI DEL
FERRO NEL DIFFERENZIAMENTO ERITROIDE NORMALE E
TALASSEMICO

DOTTORANDO: ALESSANDRA COLANCECCO

TUTOR: Prof.ssa MARIA DOMENICA CAPPELLINI

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Ch.ma Prof. MARIO CLERICI

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

INDICE

INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1: IL METABOLISMO DEL FERRO	4
Assorbimento intestinale di ferro.....	7
Il Riciclo del Ferro Ematico.....	10
Il ferro nella circolazione.....	11
Il ferro di deposito	16
Meccanismi di rilascio dal macrofago	16
Regolazione dell'omeostasi intracellulare di ferro	17
L'epcidina: il gene e la proteina	20
Regolazione dell'espressione dell'epcidina.....	23
La ferroportina: il gene e la proteina	29
Regolazione dell'espressione della ferroportina.....	31
Ferroportina ed eritropoiesi	32
Ferroportina e macrofagi	34
Regolazione dell'epcidina dall'ossigeno, dall'anemia e dall'eritropoiesi: GDF15 e HIF	37
GDF15	38
HIF.....	40
Bone Morphogenetic Protein 6.....	42
Emojuvelina (HJV).....	43
Matriptasi 2 (TMPRSS6).....	45
Emocromatosi Ereditaria (HH).....	47
Anemie da sovraccarico di ferro: CDA e β -Talassemie	50
CAPITOLO 2: LE SINDROMI TALASSEMICHE	51
La β - Talassemia.....	51
Talassemia Major.....	54
La Terapia della β – Talassemia	56
Talassemia Intermedia	58
L'Eritropoiesi inefficace.....	58
CAPITOLO 3: IL DIFFERENZIAMENTO ERITROIDE.....	61
L'emopoiesi	61
L'eritropoiesi	64
Fattori di crescita regolanti l'eritropoiesi.....	66

L'eritropoietina	68
Fattori trascrizionali regolanti l'eritropoiesi	70
Switch di sintesi delle globine	74
SCOPO	78
MATERIALI E METODI	81
Colture di cellule CD34+ derivate da sangue periferico	81
Valutazione della morfologia cellulare	83
Analisi al citofluorimetro	84
Conta cellulare	85
Colture di macrofagi	86
Analisi dell'espressione genica	87
REAL-TIME PCR	90
Dosaggio Proteico	93
Composti utilizzati	94
Analisi al citofluorimetro del ferro intracellulare	95
RISULTATI	97
Analisi del GDF15 durante il differenziamento eritroide in colture controllo	97
Analisi genica e proteica del GDF15: confronto tra colture controllo, TM e TI durante il differenziamento eritroide	100
Analisi genica dell'epcidina (HAMP): confronto tra colture controllo, TM e TI durante il differenziamento eritroide	103
Analisi del GDF15 in colture controllo, TM e TI trattate con DFO e con FAC	104
Analisi molecolare della ferroportina totale FPN e delle isoforme FPN1A e FPN1B in colture controllo, TM e TI durante il differenziamento eritroide	109
Analisi molecolare della ferroportina totale FPN e delle isoforme FPN1A e FPN1B in colture controllo, TM e TI trattate con DFO e FAC	113
Analisi del GDF15 in macrofagi controllo, TM e TI trattati con DFO e FAC	114
Analisi molecolare della ferroportina totale FPN e delle isoforme FPN1A e FPN1B in macrofagi controllo, TM e TI trattati con DFO e FAC	117
Analisi dell'espressione del recettore della Transferrina (TFR) in cellule CD34 controllo, TM e TI	118
DISCUSSIONE	120
BIBLIOGRAFIA	131

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1: IL METABOLISMO DEL FERRO

Il ferro è quantitativamente il metallo più importante dell'organismo. Gli organismi viventi, dalle forme di vita primitive alle più complesse, necessitano di ferro per sostenere molte reazioni biologiche, quali la respirazione mitocondriale, la proliferazione cellulare (attraverso il controllo dell'enzima ribonucleotide reductasi) e la sintesi di proteine come l'emoglobina e la mioglobina (1). Le funzioni biologiche del ferro si basano sulle sue proprietà chimiche, come la sua capacità di formare complessi con numerosi ligandi organici secondo modalità flessibili e dinamiche, e la sua capacità di interconversione ossidoriduttiva tra la forma ferrosa (Fe^{2+}) e la forma ferrica (Fe^{3+}). L'efficienza del Fe^{2+} come donatore di elettroni e del Fe^{3+} come accettore di elettroni, è fondamentale per molte reazioni biochimiche e rende il ferro un componente indispensabile per la vita.

Tuttavia le stesse proprietà che rendono utile il ferro lo rendono anche tossico, in quanto capace di generare radicali liberi che possono promuovere l'ossidazione delle proteine, la perossidazione dei lipidi di membrana e la modificazione degli acidi nucleici. L'aumento delle specie reattive dell'ossigeno oltre la capacità antiossidante dell'organismo viene chiamato stress ossidativo e si verifica in numerose condizioni patologiche: infiammazione cronica, danno da ischemia di riperfusion e neurodegenerazione. L'eccesso di ferro aggrava lo stress ossidativo e accelera la degenerazione tissutale, come dimostrato nelle patologie da sovraccarico di ferro primario o secondario. I livelli di ferro devono quindi essere finemente regolati tramite un'omeostasi adeguata che permetta alle cellule di utilizzare il ferro evitandone gli effetti dannosi. L'organismo umano contiene circa 3-5 g di ferro, la maggior parte del quale (~60-70%) contenuto nell'emoglobina dei globuli rossi circolanti (2), altri organi ricchi in ferro sono il fegato e i muscoli. Circa il 20-30% del

ferro corporeo è immagazzinato negli epatociti e nei macrofagi reticoloendoteliali, dove il ferro è complessato alla ferritina. La quota restante di ferro si trova nella mioglobina, nei citocromi e negli enzimi contenenti ferro (ossidasi, catalasi, perossidasi, etc). Inoltre il ferro viene “riciclato” (circa 20 mg/die) dall’emoglobina degli eritrociti senescenti nei macrofagi reticoloendoteliali per far fronte alle continue esigenze eritropoietiche. La distribuzione del ferro nell’organismo è mostrata in Figura 1.

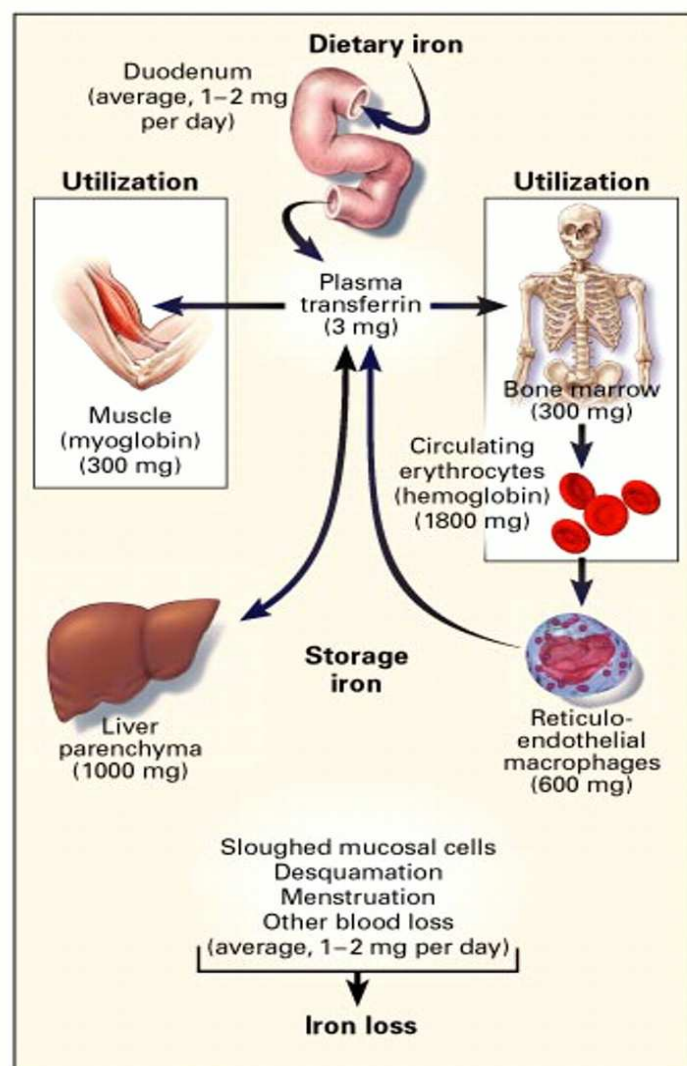


Figura 1 - Assorbimento, Distribuzione ed Eliminazione del Ferro da Parte dell’Organismo.

L'omeostasi del ferro è essenzialmente un sistema chiuso. Nel soggetto adulto sano la quantità totale di ferro (circa 4-5 grammi) è mantenuta costante grazie al bilancio tra ferro assorbito e ferro eliminato. Le perdite sono di circa 0,8 mg/die nell'uomo e 1,4 mg/die nella donna in età fertile ed avvengono tramite meccanismi non specifici quali la desquamazione cellulare o il ciclo mestruale. La stessa quantità di ferro viene assorbita ogni giorno nel tratto gastroenterico, prevalentemente a livello del duodeno e del tratto superiore del digiuno, dove il pH acido ne consente la solubilizzazione. L'assorbimento quotidiano è di solito piuttosto limitato (0,7-1 mg) e corrispondente soltanto al 5-10% del ferro totale ingerito.

Data la sua importanza, sia la carenza, sia l'eccesso di ferro nell'organismo producono danni rilevanti dal punto di vista clinico.

La manifestazione clinica più nota associata alla carenza di ferro è l'anemia mentre la condizione opposta, ossia un sovraccarico di ferro, provoca ossidazione, morte cellulare, e danno d'organo dovuti all'effetto tossico che questo metallo, in forma libera, esercita.

I primi studi molecolari sul metabolismo del ferro si concentrarono su due molecole abbondanti e facili da isolare. Nel 1937, la ferritina splenica di cavallo fu la seconda di tutte le proteine ad essere cristallizzata (3). Una decade più tardi la transferrina fu identificata come un'abbondante proteina del plasma trasportatrice del ferro (4). Queste molecole sono entrambe utilizzate in clinica per valutare lo stato del ferro. Con meccanismi diversi sia la ferritina che la transferrina sequestrano il ferro per renderlo non reattivo, evitando così la formazione di radicali dell'ossigeno con la reazione di Fenton:



❖ ASSORBIMENTO INTESTINALE DI FERRO

In individui non trasfusi, il ferro proviene esclusivamente dalla dieta. Poiché non esistono meccanismi specifici di escrezione del ferro attraverso il fegato o i reni, l'equilibrio del ferro è principalmente controllato a livello intestinale.

Lo studio di modelli animali mutanti spontanei creati in laboratorio ha determinato un importante avanzamento delle conoscenze sui meccanismi di assorbimento del ferro (5).

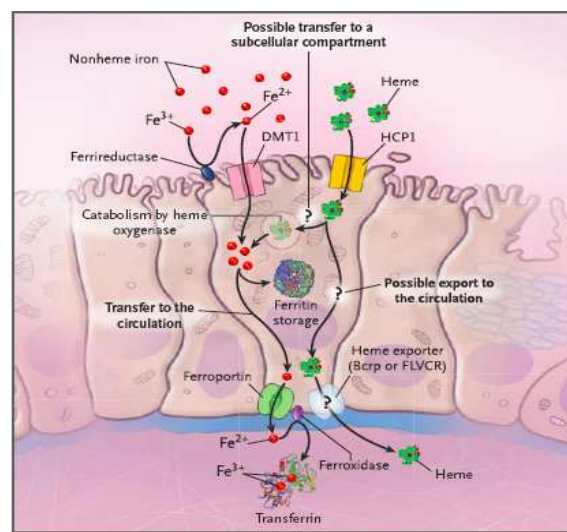


Figura 2 - Assorbimento di ferro nell'enterocita.

L'assorbimento di ferro proveniente dalla dieta avviene nell'intestino e principalmente nella porzione prossimale del duodeno (Figura 2), dove cellule polarizzate disposte in villi, gli enterociti, protrudono nel lume intestinale per massimizzare la superficie di assorbimento. Il ferro della dieta è presente come ferro eme e non-eme. Il ferro eme costituisce solo una piccola frazione del ferro ingerito con la dieta, ma è altamente biodisponibile: è captato tramite un meccanismo non ancora ben identificato che coinvolge uno specifico trasportatore e richiede il rilascio del ferro dall'eme all'interno dell'enterocita. Al contrario l'assorbimento del ferro non-eme è basso e strettamente regolato nella prima porzione del duodeno. Il ferro ferrico Fe^{3+} proveniente dalla dieta

viene ridotto a ferro ferroso a livello del lume per l'azione di una reduttasi dell'orletto a spazzola, denominata citocromo b duodenale (Dcytb), un omologo del citocromo B561 che può usare l'acido ascorbico come un cofattore (6).

La regolazione dell'assorbimento del ferro avviene a livello delle 2 interfacce dell'epitelio intestinale: la membrana apicale e la membrana basolaterale.

Il ferro Fe^{2+} entra negli enterociti assorbenti attraverso il DMT1, lo stesso trasportatore di ferro usato per il trasferimento endosomale nel ciclo della transferrina. La forma intestinale del DMT1 è prodotta da una differente isoforma di splicing del mRNA, che dà origine ad una proteina con un'estremità C-terminale alterata (7,8). Il DMT1 intestinale è localizzato principalmente sulla membrana apicale e sugli endosomi subapicali (9). I protoni necessari per il cotrasporto del metallo, forniti dall'acido gastrico, affluiscono nella porzione prossimale del duodeno dove il DMT1 è maggiormente espresso e più attivo. La richiesta di protoni come cotrasportatori spiega perché il trattamento con antiacidi o bloccanti di istamina H2 interferisca con l'assorbimento di ferro. L'espressione di DMT1 aumenta in mancanza di ferro (10) ed è regolata a livello post-trascrizionale da un 3'IRE presente nell'isoforma espressa nell'intestino (7). Il DMT1 permette l'entrata anche di altri cationi divalenti come Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , e Pb^{2+} , sebbene la sua importanza sia stata dimostrata in vivo solo per il Fe^{2+} (11).

Topi knock-out per il gene codificante il DMT1 hanno confermato che questa proteina è il principale trasportatore transmembrana di ferro nelle cellule epiteliali intestinali e, attraverso il ciclo della transferrina, nei precursori eritroidi (12). Ciò nonostante, altri tipi di cellule non richiedono DMT1 per l'uptake di ferro e questo suggerisce l'esistenza di altri importatori transmembrana di ferro. Ad eccezione dei canali del calcio di tipo L, che hanno capacità di trasportare ferro (13), non è stato identificato ad oggi nessun candidato in grado di importare atomi di ferro nelle cellule.

Il gene SLC11A2 che codifica il trasportatore DMT1 genera quattro isoforme per splicing alternativo che differiscono tra loro all'estremità 3' o 5' non tradotta (UTR) per la presenza o l'assenza di una sequenza IRE (14). Studi comparativi delle varianti di DMT1 hanno indicato che le isoforme +IRE localizzate principalmente a livello della membrana plasmatica hanno una cinetica di internalizzazione più lenta rispetto alle isoforme -IRE e sono indirizzate ai lisosomi. In contrasto la regione C-terminale delle varianti -IRE contiene peptidi segnale richiesti per un'endocitosi efficiente e localizzazione successiva negli endosomi di riciclo (15). Per questo motivo, è probabile che le isoforme +IRE siano principalmente coinvolte nel trasporto di ferro attraverso la membrana plasmatica, mentre le isoforme -IRE nel trasporto endosomiale. Sembra che il DMT1 sia regolato dai livelli di ferro con aumentata espressione della proteina negli epatociti ricchi di ferro, bassa espressione nel fegato normale e assenza di espressione negli epatociti ferro-carenti (16). Quest'osservazione è confermata dalla presenza di una sequenza IRE localizzata al 3'UTR del trascritto che potrebbe portare a una diminuzione della stabilità del mRNA in condizioni di sovraccarico di ferro e conseguente diminuzione nell'espressione di DMT1. Tuttavia, la regolazione di DMT1 è complessa ed è possibile che la regione 5'UTR del trascritto o il dominio N-terminale della proteina possano modificare gli effetti regolatori con un meccanismo tessuto-specifico. Mutazioni di DMT1 sono state descritte per la prima volta in modelli animali (10) che presentavano anemia ipocromica microcitica non correggibile con ferro orale o parentale. La prima mutazione nell'uomo è stata trovata allo stato omozigote in un paziente Ceco con anemia congenita grave e livelli di ferritina normali o lievemente aumentati (17). Le mutazioni descritte comprendono mutazioni puntiformi (E399D, G212V, R416C), delezioni che portano a perdita di esoni (V114del) o ad alterazioni dello splicing (delCTT nell'introne 4).

Una volta all'interno della cellula epiteliale intestinale il ferro ha due possibili destini. Il ferro può essere utilizzato per le esigenze della cellula, o, se non necessario, stivato nella ferritina, in questi casi sarà eliminato assieme all'enterocita per desquamazione nel lume intestinale. Alternativamente, se necessario all'organismo, il ferro passerà attraverso la membrana basolaterale alla transferrina: il passaggio dipenderebbe dall'esportatore del ferro IREG, o ferroportina1 (anche chiamata FPN1, IREG1, MTP1, SCL39A1, e ora SCL40A1) (17-18 29-31) che è l'unico esportatore di ferro conosciuto ad oggi.

❖ **IL RICICLO DEL FERRO EMATICO**

La maggior parte del ferro presente nell'organismo si trova legato all'emoglobina e la fagocitosi degli eritrociti senescenti da parte dei macrofagi garantisce un efficiente riciclo del ferro. Al giorno vengono recuperati da questa via di riciclo circa 20-25 mg di ferro che verranno poi utilizzati per la produzione di nuova emoglobina durante l'eritropoiesi midollare (Figura 3). I macrofagi deputati alla degradazione dei globuli rossi senescenti si trovano principalmente nella milza, nel midollo osseo e nelle cellule del Kupffer. Durante la loro permanenza nel circolo sanguigno (120 giorni circa), i globuli rossi subiscono delle modificazioni biochimiche a livello della loro membrana: esternalizzazione di fosfatidil – serina, perossidazione delle lipoproteine, perdita di residui di acido sialico ed espressione degli antigeni di senescenza che costituiscono dei segnali per i macrofagi che vanno così ad identificare le cellule che devono essere degradate mediante un processo di fagocitosi. Il gruppo eme viene distrutto ed il ferro ad esso legato viene rilasciato nel citoplasma del monocita, ora lo ione può intraprendere diverse vie: complessarsi alla ferritina e rimanere all'interno della cellula, oppure fuoriuscire da essa mediante la ferroportina per poi essere captato dalla transferrina plasmatica.

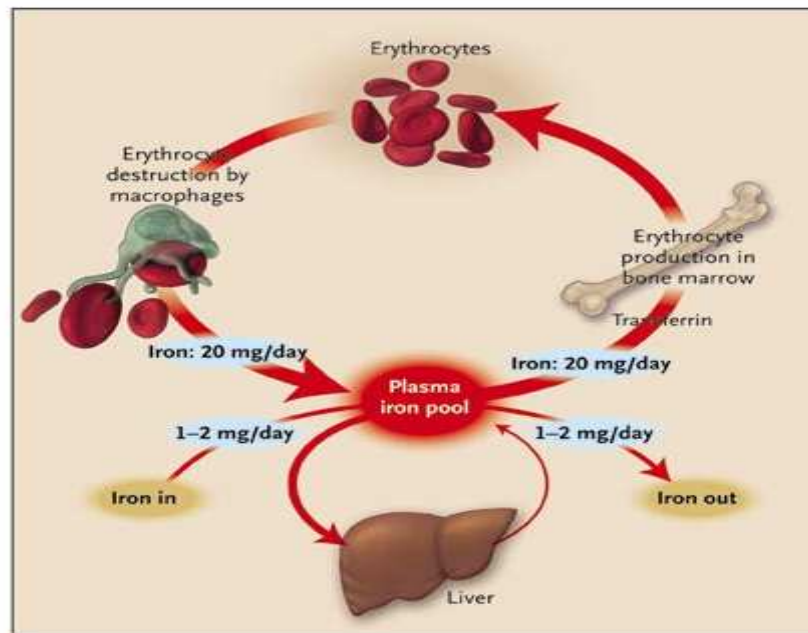


Figura 3 - Riciclo del ferro ematico.

❖ IL FERRO NELLA CIRCOLAZIONE

La transferrina è una glicoproteina monometrica che funge da trasportatore di ferro plasmatico mantenendolo in forma solubile e non tossica, incapace di innescare la reazione di Fenton/Haber-Weiss (18). È prodotta e secreta principalmente dagli epatociti, e possiede due domini omologhi leganti ognuno un atomo di ferro allo stato trivalente (Fe^{3+}). Negli individui sani, soltanto il 30% della transferrina circolante lega il ferro, mentre nelle condizioni patologiche di sovraccarico, il ferro satura gradualmente la capacità legante della transferrina e forma complessi a basso peso molecolare attivi dal punto di vista ossidativo. Il ferro non legato alla transferrina (non-transferrin-bound iron, NTBI) viene internalizzato dai tessuti tramite meccanismi non ancora identificati e causa danni cellulari e lesioni tissutali.

La transferrina ha tre funzioni principali: solubilizza il Fe^{3+} , altrimenti insolubile a pH fisiologico, lega il ferro con elevata affinità impedendogli di generare radicali tossici,

permette l'internalizzazione del ferro nella cellula attraverso l'interazione con il suo recettore (TfR1) (Figura 4).

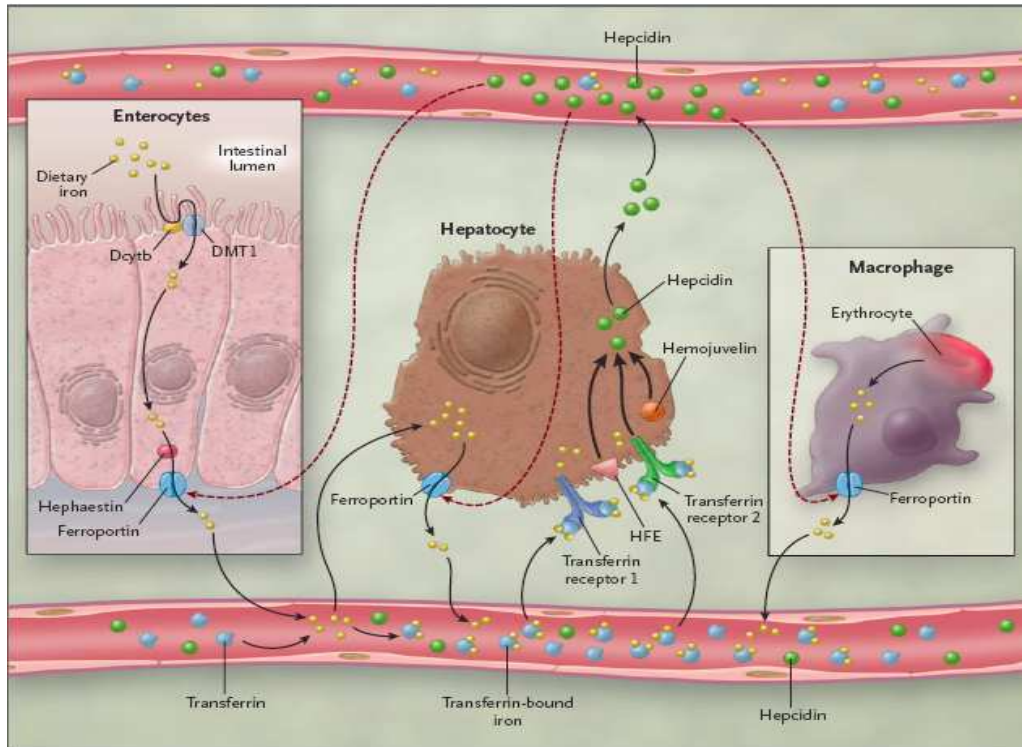


Figura 4 – Metabolismo del ferro.

TfR1 è un omodimero costituito da due subunità identiche di circa 90 KDa, in grado di legare due molecole di transferrina con un'affinità molto alta (18). Il TfR1 è presente in tutte le cellule nucleate dell'organismo, ma è espresso ad alti livelli nei precursori eritroidi, nei linfociti attivati, nelle cellule cerebrali placentari e nei tumori. L'espressione elevata del recettore è correlata alla necessità di captare il ferro in modo massivo per sostenere la sintesi di emoglobina ed eme (nelle cellule eritroidi), il trasporto di ferro (nelle cellule placentari) e la proliferazione cellulare.

In molti tessuti, la captazione del ferro avviene attraverso un meccanismo noto come "ciclo della transferrina" (Figura 5).

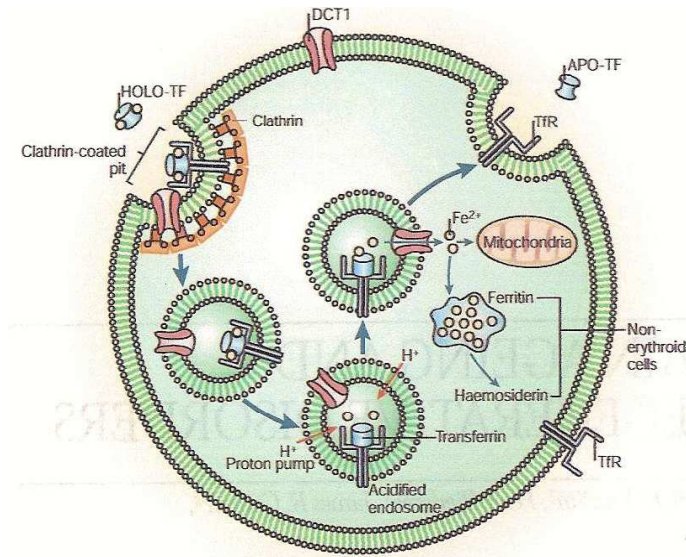


Figura 5 - Ciclo della transferrina.

Durante tale ciclo, i frammenti di membrana cellulare che trasportano complessi Tfr1-transferrina vanno incontro ad endocitosi tramite endosomi ricoperti di clatrina. Rimosso il rivestimento di clatrina, gli endosomi subiscono acidificazione con l'ingresso di protoni, causando un cambiamento conformazionale nel complesso Tfr1-transferrina e promuovendo il rilascio di ferro.

Sebbene molti tessuti esprimano Tfr1 a bassi livelli, pochi tipi di cellule sono strettamente dipendenti dal ciclo della transferrina per la captazione del ferro. Ciò nonostante, l'inattivazione del gene di Tfr1 (Tfr1) nel topo è incompatibile con la vita: topi Tfr1^{-/-} (o knock out) muoiono per grave anemia e alterazioni neurologiche al dodicesimo giorno di vita embrionaria (19). In accordo con la funzione indispensabile di Tfr1, nell'uomo non sono note patologie da deficit di Tfr1. Topi eterozigoti per l'inattivazione di Tfr (Tfr1^{+/-}) presentano un quadro di lieve ipocromia, ma depositi di ferro aumentati nei macrofagi midollari e splenici. Da queste osservazioni si deduce che il Tfr1 è indispensabile per l'eritropoiesi, oltre che per lo sviluppo del SNC, ma sembra non essenziale per l'uptake del ferro di altre cellule dell'organismo.

Un nuovo membro della famiglia dei recettori della transferrina (TfR2) è stato clonato e sequenziato qualche anno fa (20). L'analisi di sequenza proteica ha rivelato che il TfR2, come il TfR1, è una glicoproteina transmembrana, il cui dominio extracellulare mostra il 66% di omologia con il TfR1, ma la cui distribuzione tissutale appare ristretta agli epatociti e alle cellule eritroidi.

Il TfR2 ha una funzione simile al TfR1, ossia interagisce con la transferrina in determinate condizioni di pH. Tuttavia l'affinità di questo recettore per la transferrina legata al ferro è 25 volte più bassa rispetto a quella del TfR1. Inoltre i pattern di espressione dei due recettori della transferrina sono distinti. Mutazioni nel recettore 2 della transferrina sono responsabili di una rara forma di emocromatosi ereditaria, chiamata HFE3 (21).

All'interno dell'endosoma, il ferro inorganico liberato è ridotto dalla feroreduttasi STEAP3 a Fe^{2+} (24-10), e diventa substrato per il trasportatore transmembrana di metalli divalenti DMT1 (divalent metal transport 1 o SCL11A2), formalmente chiamato NRAMP2, DCT1 (10,11) (Figura 6).

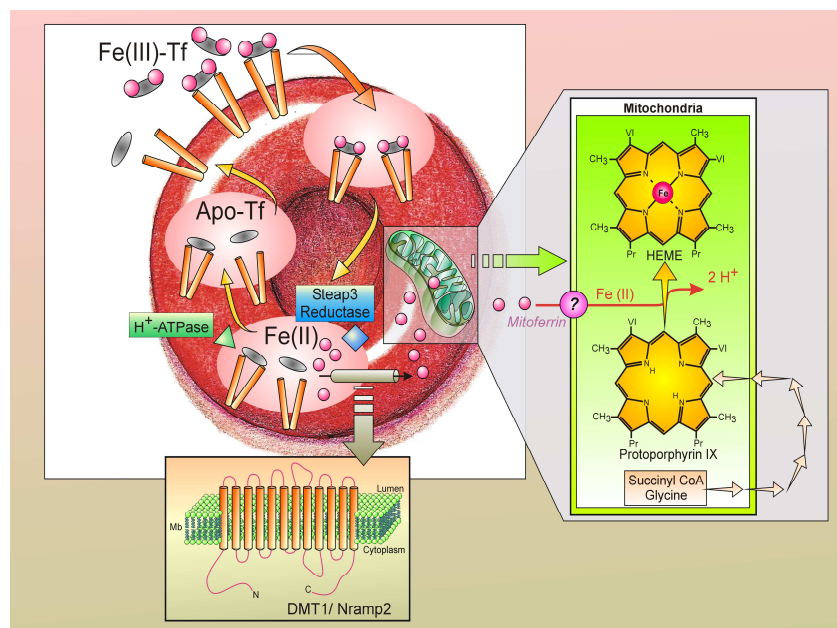


Figura 6 – Destino del ferro all'interno dell'eritrocita.

Attraverso modelli animali (22), è stato dimostrato che il DMT1 è elettrogenico, poiché richiede il cotrasporto di protoni per esportare il Fe^{2+} attraverso la membrana. Questo è reso possibile dal basso pH ambientale degli endosomi (~ 5.5).

Nel citoplasma, il ferro è incorporato nella protoporfirina per produrre il gruppo eme oppure viene trattenuto nelle forme di deposito. Al contempo, gli endosomi che contengono la transferrina e il suo recettore riportano le proteine sulla superficie cellulare affinché siano riutilizzati.

Per produrre eme è indispensabile che il ferro oltrepassi la membrana mitocondriale impermeabile agli ioni. Recentemente è stato identificato l'importatore mitocondriale di ferro chiamato mitoferrina (anche conosciuta come SLC25A37), una proteina transmembrana fondamentale per la cessazione di ferro alla ferrochelatasi e per il suo inserimento nella protoporfirina IX. È interessante notare che mutazioni della mitoferrina provocano un disordine clinico simile alla protoporfirina eritropoietica causata da mutazioni nel gene della ferrochelatasi (23).

In passato è stato ipotizzato che il ferro assimilato dai precursori eritroidi venisse incorporato nell'emoglobina e rimanesse all'interno della cellula fino alla senescenza dell'eritrocita. Recentemente, Quigley e colleghi (24) hanno descritto un esportatore di eme, FLVCR, che sembra necessario per il normale sviluppo eritroide. Tale studio ipotizza che gli eritroblasti necessitino di un meccanismo di esporto dell'eme in eccesso per evitarne la tossicità. Topi knock-out per il gene codificante FLVCR (25) non completano l'eritropoiesi con conseguente morte fetale. Quando invece il gene FLVCR viene inattivato dopo la nascita, gli animali sviluppano anemia microcitica grave, dimostrando che l'esporto di eme è indispensabile alla normale eritropoiesi.

❖ **IL FERRO DI DEPOSITO**

La molecola di ferritina è formata da una struttura apoproteica (costituita da 24 subunità di 44 KDa) con una cavità (26), nella quale possono essere ospitati fino a 4500 atomi di ferro. Il diametro della ferritina può raggiungere i 70-80 Å sotto forma di complesso inorganico. Il processo di cattura del ferro è rilevante dal punto di vista biologico, in quanto gli atomi di ferro sono resi non tossici ed insieme biologicamente accessibili, se richiesti.

Esiste una ferritina tissutale (intracellulare o citoplasmatica) che funge da deposito di ferro all'interno della cellula, ed una ferritina sierica destinata alla glicosilazione e al rilascio del ferro nel siero.

I livelli di ferritina sierica sono strettamente correlati con l'entità dei depositi marziali di ferro, tanto da comportare l'utilizzo della ferritina stessa come indice di valutazione dei depositi marziali, assumendo che a 1 µg/l di ferritina corrispondono 8-10 mg di ferro.

Nelle condizioni di deficit di ferro la concentrazione della ferritina può scendere fino al di sotto di 10 µg/litro, mentre in condizioni di sovraccarico ha valori elevati da 1000 a 10000 µg/litro.

❖ **MECCANISMI DI RILASCIO DAL MACROFAGO**

La maggior parte del ferro viene riutilizzata grazie al catabolismo dell'emoglobina: a fronte di 1-2 mg di ferro ricambiati ogni giorno vengono riutilizzati circa 20-30 mg rilasciati dal macrofago. Bisogna quindi ipotizzare che segnali analoghi a quelli destinati all'intestino arrivino al macrofago per regolarne il rilascio di ferro in base alle richieste dell'eritropoiesi. L'importanza del rilascio si evidenzia in situazioni in cui il rilascio di ferro al macrofago è bloccato per difetti genetici di proteine dell'esporto o per l'azione di citochine infiammatorie. Tuttavia i meccanismi di rilascio non sono stati del tutto chiariti.

Un ruolo chiave è certamente svolto da ceruloplasmina e da ferroportina, come dimostrato da studi sulle rispettive patologie.

❖ **REGOLAZIONE DELL'OMEOSTASI INTRACELLULARE DI FERRO**

Poiché i mammiferi non possiedono meccanismi fisiologici di escrezione del ferro, l'omeostasi del ferro è regolata principalmente a livello dell'assorbimento intestinale. Secondo studi recenti, sono tre i segnali regolatori che contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi del ferro (2). Il primo è chiamato “regolatore della dieta” e deriva dall'evidenza, nota da lungo tempo, che dopo l'ingestione di ferro gli enterociti preposti all'assorbimento intestinale di ferro risultano resistenti ad acquisire ferro per molti giorni. Questo fenomeno, descritto anche come “blocco della mucosa”, viene probabilmente causato dall'accumulo intracellulare di ferro, che a sua volta sopprime l'espressione delle proteine di trasporto del ferro che si trovano a livello delle cripte duodenali (DMT1 e ferroportina) tramite un meccanismo mediato dalle iron-regulation proteins, IRPs (27).

Un secondo segnale, chiamato “regolatore dei depositi” controlla la captazione di ferro come risposta alle fluttuazioni di ferro nell'organismo. È noto che in condizioni di carenza di ferro, l'assorbimento dello stesso a livello duodenale aumenta di due-tre volte, fino a quando i depositi di ferro non sono ripristinati. È stato ipotizzato che questo tipo di regolazione richieda la “programmazione” delle cellule precursori delle cripte (28) nell'epitelio duodenale a seguito della saturazione della transferrina plasmatica.

Il terzo segnale, chiamato “regolatore eritropoietico” modula l'assorbimento di ferro in risposta alle esigenze dell'eritropoiesi. Dal momento che la maggior parte del ferro dell'organismo è richiesto dal midollo osseo per l'emoglobinizzazione dei globuli rossi, non sorprende che questo segnale abbia una funzione dominante sul controllo dell'omeostasi del ferro. Inoltre, è in grado di aumentare l'assorbimento del ferro

indipendentemente dai livelli di deposito del ferro. Questo spiega anche l'accumulo patologico di ferro presente in disordini caratterizzati da un'eritropoiesi inefficace (come le sindromi talassemiche, le anemie diseritropoietiche congenite, o l'atransferrinemia), nei quali l'assorbimento del ferro aumenta sensibilmente nonostante i depositi dell'organismo siano saturi.

L'omeostasi intracellulare di ferro è principalmente mantenuta attraverso il meccanismo regolatorio post-trascrizionale dei geni implicati nel metabolismo del ferro: il sistema IRE-IRP (Figura 7). La regolazione è esercitata da specifici sensori del ferro, proteine citoplasmatiche denominate Iron Regulatory Protein (o IRPs), che possono interagire con sequenze nucleotidiche definite IRE (Iron Responsive Element) presenti nella sequenza 5' o 3' non tradotte (5' o 3' UTR) degli mRNA di alcuni geni regolati dal ferro (29). Gli elementi IRE sono formati da circa 30 nucleotidi, con una caratteristica conformazione "a stelo". Nel mRNA della ferritina L o H, l'IRE è localizzato nella regione 5'UTR. Nel mRNA del TfR esistono 5 elementi IRE, nella regione 3'UTR. Quando il ferro è carente nelle cellule, il legame IRP-IRE blocca la traduzione di ferritina e facilita quella di TfR1, stabilizzando il corrispondente mRNA. L'inverso succede quando il ferro è in eccesso. Le proteine sensori del ferro sono due: IRP1, che esplica attività aconitasica nel ciclo di Krebs, e IRP2. Entrambe sono in grado di legare gli stessi IRE, ma non sono equivalenti. La carenza di ferro induce la mancata formazione del cluster Fe-Zn e fa perdere la funzione aconitasica ad IRP1 che acquisisce la funzione IRP. La proteina IRP2 non ha funzione aconitasica ed è regolata attraverso la degradazione proteosomica, che è innescata dal legame di IRP2 con il ferro. Il sistema IRE-IRP permette una regolazione post-trascrizionale rapida e coordinata. Infatti uno stesso stimolo (carenza di ferro, ipossia ecc.) può regolare simultaneamente numerosi mRNA che possiedono elementi IRE, tra cui i

trasportatori intestinali (DMT1, ferroportina 1), transferrina e l'enzima ALA-sintetasi coinvolto nella primo step della sintesi dell'eme.

Non è ancora chiaro perché sia necessario avere 2 IRPs, ma recenti osservazioni suggeriscono che le due proteine possano rispondere in modo differente alle variazioni fisiologiche della pressione di ossigeno (30). Esse potrebbero anche avere come target differenti mRNAs contenenti IRE.

L'inattivazione di IRP1 nel modello murino non causa un fenotipo particolare, mentre l'inattivazione di IRP2 comporta livelli elevati di ferritina nel cervello e sintomi neurodegenerativi in età adulta, provocati dalla disfunzione di alcuni gruppi di neuroni (31).

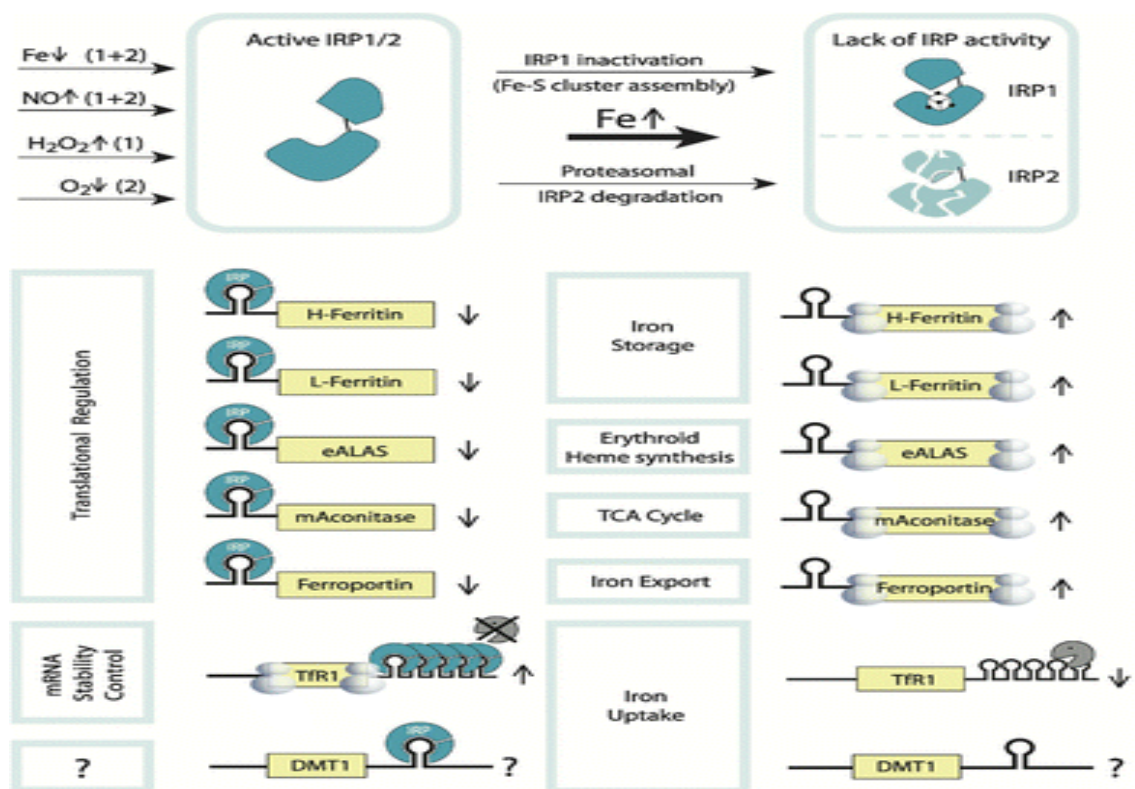


Figura 7 - Rappresentazione dell'azione di IRE/IRP.

❖ **L'EPCIDINA: IL GENE E LA PROTEINA**

Nel 2001 è stata scoperta una proteina epatica con funzione antimicrobica chiamata EPCIDINA (*hepcidin*, *hep*=epatocita, *idine*= indica l'attività antimicrobica).

L'omeostasi sistemica del ferro implica un controllo accurato del suo assorbimento intestinale e del suo utilizzo nell'eritropoiesi, nonché un riciclo efficace dagli eritrociti senescenti ed un immagazzinamento controllato da parte degli epatociti e macrofagi.

Il regolatore principale del metabolismo del ferro è rimasto ignoto sino a pochi anni fa. Nel 2001 è stata identificata una proteina, denominata epcidina o LEAP1 (Liver-expressed-antimicrobial peptide), prodotta dal fegato in condizioni di sovraccarico di ferro ed in grado di bloccare l'assorbimento di ferro e il rilascio dal macrofago (32). Si tratta di un peptide con attività antimicrobica, codificato da una coppia di geni nel topo e da un gene in copia singola (HAMP) nell'uomo.

Studi cristallografici sulla struttura dell'epcidina di 25 aminoacidi hanno rilevato che il peptide contiene quattro ponti disolfuro, con la possibilità di assumere conformazioni multiple (33). Tramite spettrometria a dicroismo circolare è stato dimostrato che l'epcidina urinaria umana è ricca di foglietti β e la successiva spettroscopia con risonanza magnetica nucleare (RMN) ha confermato la presenza di una struttura "a forcina" stabilizzata dai quattro ponti disolfuro, uno dei quali coinvolge due cisteine contigue (Figura 8).

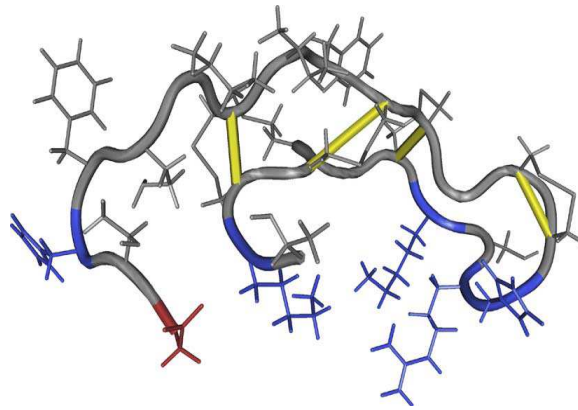


Figura 8 – Struttura cristallografica dell'epcidina.

La struttura a forcina del peptide mostra inoltre una distribuzione anfipatica dei residui, con amminoacidi idrofobici sul lato convesso e amminoacidi carichi positivamente sul lato concavo. Sebbene questa configurazione sia tipica dei peptidi antimicrobici ricchi in cisteine, l'epcidina tuttavia mostra *in vitro* una modesta attività antimicrobica solo a concentrazioni molto alte (34) e il ruolo funzionale di questa struttura rimane ancora dubbio.

L'epcidina viene sintetizzata in modo predominante dal fegato, anche se bassi livelli di mRNA sono presenti in altri tessuti, come cuore, milza e cervello. Il gene che codifica il peptide si trova sul cromosoma 19q13 e contiene tre esoni che danno un prodotto di 84 amminoacidi (*pre-proepcidina*). Questo precursore è dapprima processato in un peptide di 72 amminoacidi (*pro-epcidina*) che comprende una sequenza segnale di 24 amminoacidi ed uno specifico sito di clivaggio al terminale NH₂ per dare la forma circolante di 25 amminoacidi. Si conosce poco riguardo al meccanismo di processamento del precursore dell'epcidina e all'importanza della regolazione post-traduzionale sui livelli di peptide circolante. Studi recenti hanno evidenziato che la pro-epcidina viene espressa ad alti livelli negli epatociti, localizzandosi nell'apparato di Golgi e nelle sue vescicole (35). Qui si accumula prima di ricevere un segnale per la sua secrezione. La presenza della pro-epcidina nel siero

suggerisce che questo precursore possa essere coinvolto nella regolazione del metabolismo del ferro (43). Tuttavia, l'esistenza di una correlazione tra il mRNA dell'epcidina e i livelli di peptide sembra implicare che il processamento della pro-epcidina non rappresenti una tappa limitante per la quota di peptide maturo (36).

In vitro, l'epcidina umana mostra attività antibatteriche e antifungine (37) a concentrazioni di 10-30 μ M. Come nel caso di altri peptidi cationici, questa attività è favorita da soluzioni a bassa forza ionica. La concentrazione urinaria dell'epcidina è compresa normalmente in un range di 3-30 nM (10–100 ng/ml) e può aumentare fino a 10 volte durante le infezioni. Non è chiaro se l'attività antimicrobica dell'epcidina rappresenti un'importante funzione biologica, un residuo dell'evoluzione, od una conseguenza della sua conformazione strutturale dettata dalla sua attività come ormone regolatore del ferro.

Il coinvolgimento dell'epcidina nel metabolismo del ferro è stato suggerito dall'osservazione che la sintesi dell'epcidina era indotta dal ferro della dieta (38). Il suo ruolo come regolatore negativo dell'assorbimento di ferro nell'intestino tenue è stato però scoperto accidentalmente utilizzando un topo knock-out per un gene chiamato USF2 che si trova vicino al gene HAMP. Il topo knockout per USF2 sviluppava un fenotipo di emocromatosi con progressiva deposizione di ferro nel fegato e nel pancreas (39). Ricercando le cause di tale sovraccarico, si scoprì che l'animale era privo del mRNA dell'epcidina, poiché la distruzione del gene USF2 creava un effetto accidentale anche sui geni vicini, incluso il gene HAMP. La conferma definitiva del ruolo essenziale dell'epcidina nell'uomo è giunto dallo studio di due famiglie affette da emocromatosi giovanile i cui soggetti portatori della patologia mostrarono di essere omozigoti per mutazioni deleterie nel gene dell'epcidina (40).

Studi successivi hanno chiarificato il ruolo del peptide come regolatore centrale dell'omeostasi del ferro. Topi che over-esprimevano l'epcidina sotto il controllo di un

promotore specifico per il fegato nascevano con un'anemia da carenza di ferro letale, e potevano essere salvato soltanto con una somministrazione parenterale (e non orale) di ferro (41). Questi esperimenti dimostravano che, prima della nascita, l'epcidina era in grado di inibire il trasporto di ferro attraverso la placenta e, dopo la nascita, inibiva l'assorbimento di ferro nell'intestino tenue. Inoltre apparve chiaro che l'attività inibitoria dell'epcidina transgenica non poteva essere superata da altri meccanismi, anche durante la severa anemia.

I modelli animali indicano quindi che l'epcidina agisce:

- come regolatore negativo dell'assorbimento intestinale di ferro;
- come regolatore negativo del trasporto di ferro attraverso la placenta;
- come regolatore negativo del rilascio di ferro nei macrofagi (principalmente splenici);
- come regolatore negativo dell'esporto di ferro dagli epatociti (Figura 9).

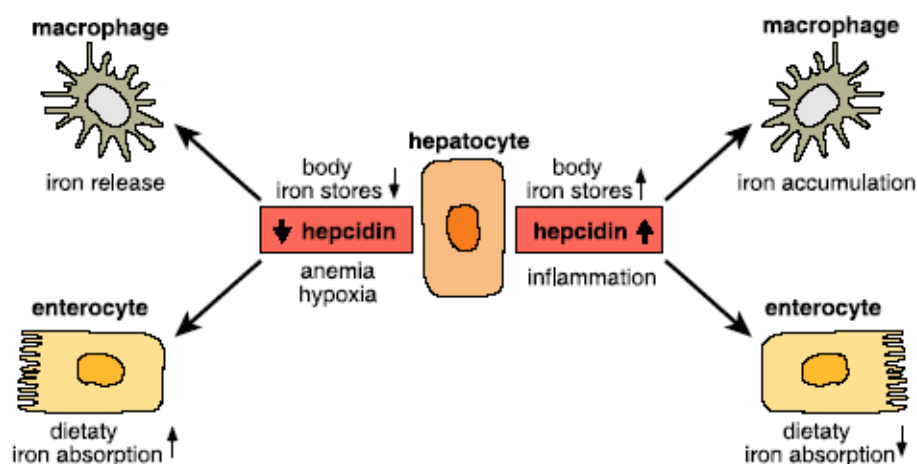


Figura 9 - Funzione regolatoria dell'epcidina.

La quantità di mRNA di epcidina nelle cellule del fegato diminuisce in risposta all'ipossia e all'eritropoiesi inefficace (sovrapponendosi alla risposta alla carenza di ferro) (42,43) e

aumenta in risposta al trattamento con lipopolisaccaride o durante processi infiammatori di altra eziologia (44). Questi effetti opposti sono in accordo con il ruolo centrale di regolatore del ferro: la diminuzione dei livelli plasmatici della proteina, richiesta dall'eritropoiesi e dall'ipossia, promuove l'assorbimento intestinale di ferro e il suo rilascio dai macrofagi. Al contrario, l'aumento dell'epcidina in risposta al sovraccarico e all'infiammazione inibisce l'assorbimento del ferro e il suo rilascio.

Studi recenti hanno identificato un sito consenso per STAT3 in grado di mediare l'induzione dell'epcidina nell'infiammazione, attraverso un sistema di cascata di segnali scatenato dall'interleuchina-6 (45,46). Inoltre a livello del promotore esiste anche un sito di legame per il fattore di trascrizione indotto dall'ipossia HIF (von Hippel-Lindau/hypoxia-inducible transcription factor): HIF α agisce come repressore quando si lega al promotore dell'epcidina (47). Sono stati identificati potenziali siti di legame anche per C/EBP α , USF2, HNF4 α , p53 e altri fattori trascrizionali altamente espressi, ma non è ancora chiaro quale ruolo abbiano nella regolazione dell'espressione dell'epcidina in vivo (48-49).

Il "signaling" attraverso la cascata del "Bone Morphogenetic Protein" (BMP) mediante le proteine "Son of Mother Against Decapentaplegic" (SMAD) rimane il maggiore meccanismo conosciuto per attivare la trascrizione di epcidina. Questa connessione tra BMPs ed epcidina è stata scoperta da 2 ricerche indipendenti. Nel corso dei loro studi del "signaling" cellulare, Wang e colleghi inattivavano esclusivamente negli epatociti il gene codificante una proteina SMAD, SMAD4 (50). Con loro sorpresa, il fenotipo dominante ottenuto con tale inattivazione fu un'emocromatosi grave, simile a quella osservata in topi privi di epcidina. In contemporanea, Babbitt e colleghi studiando la proteina emojuvelina (HJV) mutata in pazienti con emocromatosi giovanile (51) dimostrarono che l'emojuvelina agiva come un co-recettore di BMP per stimolare la trascrizione di epcidina. In entrambi

gli studi l'espressione dell'epcidina era stata stimolata dal trattamento con BMPs, in una maniera dipendente dalla presenza di SMAD4 (50), BMPs e emojuvelina (51).

Sembra probabile che le SMADs attivate leghino direttamente il promotore dell'epcidina in risposta al segnale di BMP. Tuttavia, in contrasto con altri fattori trascrizionali, i siti consenso per il legame SMAD sono altamente variabili e difficili da predire. Sebbene Truska e colleghi abbiano localizzato elementi responsivi al BMP nel promotore dell'epcidina (52), rimane ancora da stabilire come avvenga esattamente la regolazione trascrizionale attraverso BMP.

❖ **REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELL'EPCIDINA**

I fattori che regolano l'omeostasi del ferro modulano anche i livelli di epcidina. L'epcidina è regolata sia dalle quantità di ferro-transferrina circolante, sia dalle riserve intracellulari di ferro. Le variazioni quantitative del ferro di deposito, l'eritropoiesi, l'infiammazione e l'ipossia sono fattori che influenzano l'assorbimento di ferro nell'intestino e il suo rilascio dalle cellule, e sono quindi i più importanti fattori sistemici che regolano i livelli di mRNA di epcidina nel fegato. L'espressione di epcidina aumenta in risposta al ferro orale e parenterale e diminuisce in condizioni di deficit di ferro. La regolazione di epcidina da parte del ferro agisce con un meccanismo a feedback che permette al ferro di entrare nel plasma quando la domanda è alta, ma ne limita il rilascio quando esso non è richiesto. Il meccanismo con cui il ferro agisce non è ancora stato chiarito completamente, ma parecchi studi suggeriscono che sono tre le proteine che contribuiscono, individualmente o in associazione tra loro, alla regolazione della sintesi di epcidina: HFE e TfR2 (come molecole di rilevamento del ferro extracellulare) HJV (come molecola di rilevamento del ferro intracellulare attraverso il pathway delle bone morphogenetic protein) (Figura 10).

HFE è una proteina di membrana, appartenente alla famiglia delle HLA di classe I, mutata nella forma più comune di emocromatosi ereditaria. È espressa principalmente a livello epatico, a bassi livelli in molti altri tessuti. Studi recenti (53,54) hanno evidenziato che la proteina HFE interagisce con il Tfr1 sulla membrana basolaterale delle cellule indifferenziate delle cripte, alla base dei villi duodenali. HFE compete con la transferrina per il sito di legame sul Tfr1, sebbene la transferrina diferrica abbia maggiore affinità di legame per il recettore. A basse % di saturazione della transferrina, HFE è sequestrata da Tfr1 e non è in grado di interagire con Tfr2 (omologo alla forma1 ma principalmente espresso nel fegato dove viene anche sintetizzata l'epcidina) e di conseguenza non induce l'espressione di epcidina.

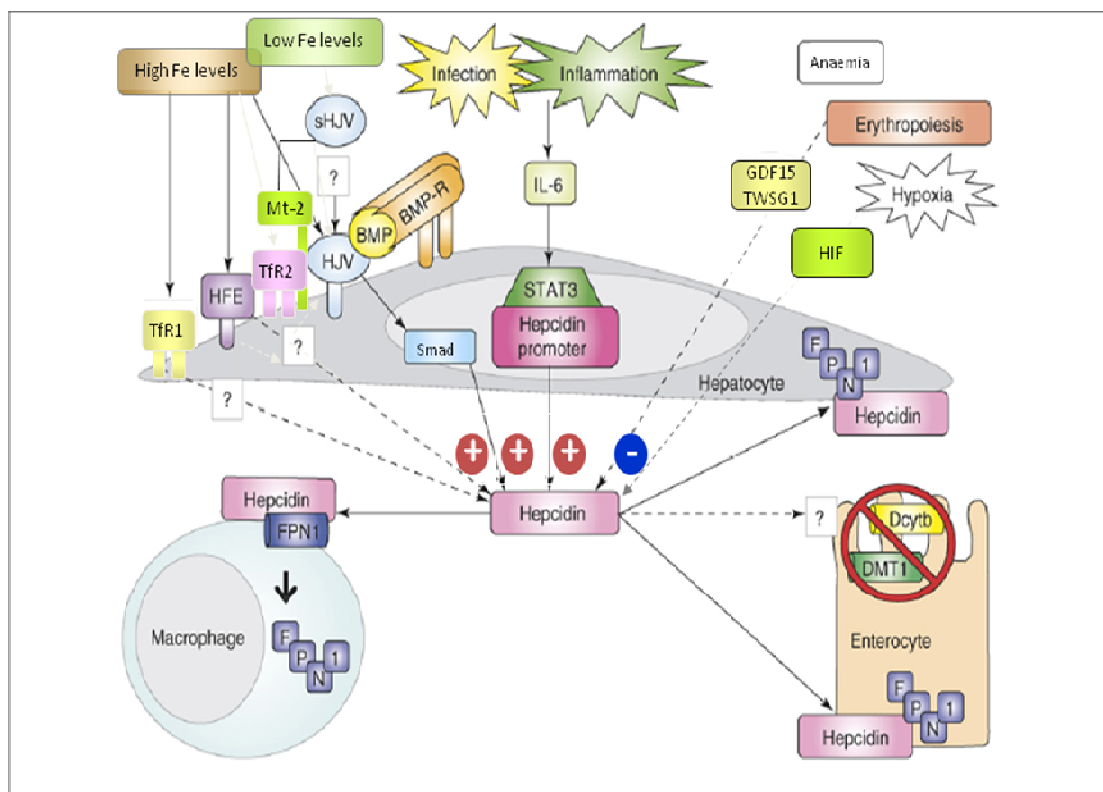


Figura 10 – Regolazione dell'espressione dell'epcidina.

L'emojuvelina appartiene alla famiglia delle RGM (Repulsive Guidance Molecule), ed è sintetizzata dagli epatociti come proteina di membrana legata a GPI (glicosilfosfatidilinositolo). Si comporta come co-recettore per BMP-2, 4 e 6 (55,56). BMP, attraverso la cascata di trasduzione del segnale di SMAD, è il principale attivatore dell'espressione dell'epcidina.

A livello extracellulare BMP-2, 4 e 6 si legano all'emojuvelina di membrana (m-HJV) e al recettore di BMP (BMPR). Questo induce la fosforilazione di SMAD-1, 5 e 8 con formazione di complessi eteromerici in grado di attivare il mediatore comune SMAD4. A seguito della traslocazione nucleare, i complessi eteromerici SMAD stimolano la trascrizione del gene HAMP.

Sebbene molti ligandi della famiglia BMP siano in grado di legare l'epcidina in vitro e in vivo, recentemente è stato dimostrato che solo BMP6 è responsabile dell'attivazione ferro-dipendente della cascata SMAD.

Esiste anche una forma solubile di emojuvelina (s-HJV), prodotta dal fegato e dal muscolo scheletrico, che competendo con la mHJV per i ligandi di BMP, antagonizza l'espressione di epcidina (57). Il pro-ormone furina convertasi è responsabile del rilascio di sHJV; la secrezione di HJV è regolata dal ferro e dall'ipossia.

Un altro segnale in grado di indurre l'espressione di epcidina appartiene al gruppo delle citochine pro-infiammatorie: l'interleuchina 6 (IL6) stimola l'espressione dell'epcidina in vivo attraverso il pathway JAK/STAT3 causando riduzione di ferro sierico, ritenzione di ferro nei macrofagi e blocco dell'assorbimento intestinale (58).

Al contrario, la carenza di ferro, l'anemia e l'ipossia inibiscono la sintesi di epcidina per rispondere alle esigenze eritropoietiche. Questa risposta multifattoriale richiede diversi segnali: in carenza di ferro diminuiscono i livelli di BMP6 ed aumentano i livelli sHJV che contribuiscono alla repressione di epcidina.

Recentemente è stato dimostrato che il GDF15, un membro della famiglia dei TGF- β (Tumor Growth Factor), media la soppressione di epcidina nella talassemia (59). Poiché concentrazioni elevate di GDF sono state osservate nel sangue di pazienti con β -talassemia, è stato ipotizzato che il GDF15 overespresso a causa dell'espansione midollare possa contribuire al sovraccarico di ferro inibendo l'espressione di epcidina.

Nello stesso modo HIF1, un eterodimero la cui espressione è regolata a livello post-traduzionale, può inibire l'epcidina in risposta all'ipossia. In presenza di ossigeno, HIF1 α è modificato da una idrossilasi ferro-dipendente ed è degradato attraverso il pathway mediato dall'ubiquitina. In caso di ipossia o chelazione di ferro l'attività dell'idrossilasi è inibita, HIF1 α si accumula e trasloca nel nucleo dove lega il complesso ARNT/HIF1 β . L'eterodimero HIF1 lega sequenze HRE (Hypoxic Responsive Element) sul promotore dell'epcidina e ne riduce l'espressione (47) (Figura 11). La rilevanza dell'ipossia sulla regolazione di epcidina è dunque tanta ma non chiara, in particolare non si conosce se HIF regoli la trascrizione di epcidina in modo diretto o indiretto.

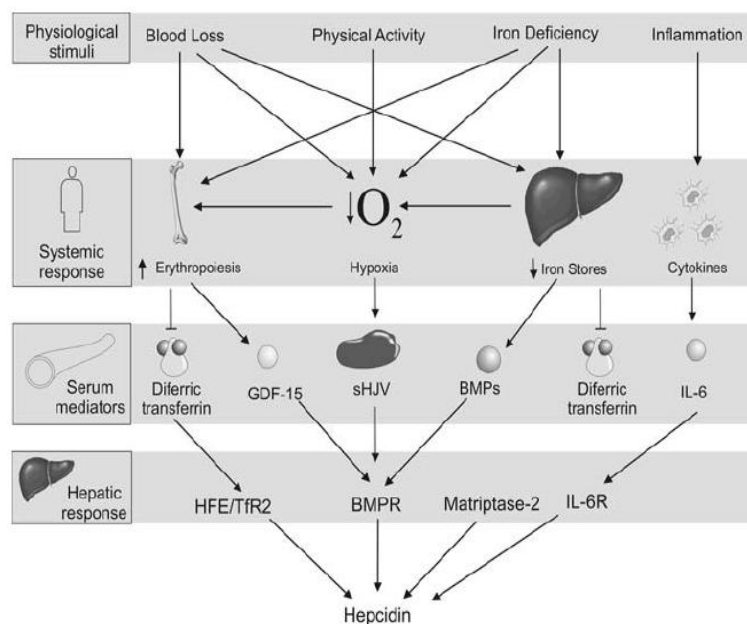


Figura 11 - Regolazione sistemica dell'epcidina.

❖ LA FERROPORTINA: IL GENE E LA PROTEINA

La ferroportina è l'unico esportatore di ferro nei vertebrati fin ora conosciuto. Studi condotti su zebrafish e topi hanno dimostrato che la completa perdita dell'esportatore durante lo sviluppo embrionale è letale a causa dell'incapacità di trasportare lo ione dalla madre all'embrione attraverso la placenta. La presenza della ferroportina è stata rilevata in tutti i tessuti che presentano un maggiore afflusso di ferro, come gli enterociti duodenali dove la ferroportina è responsabile del trasporto di ferro introdotto con la dieta dalla membrana basolaterale al circolo (60,61), i macrofagi dove FPN1 esporta ferro dal citosol al circolo, gli epatociti e la placenta che trasporta ferro dalla madre al feto (62,63,64). Studi su topi aventi un silenziamento selettivo del gene, che lo rende espresso nell'interfaccia feto-madre, ma lo inattiva negli altri tessuti, hanno osservato lo sviluppo precoce di ferro deplezione nei nuovi nati causato dall'impossibilità di esportare il ferro intestinale dall'enterocita al flusso sanguigno. La ferroportina (FPN1 o SLC40) è un esportatore avente 12 domini transmembrana, con entrambe le estremità C ed N terminali poste nel lato citosolico, è presente sulle membrane basolaterali degli enterociti, sulle membrane dei macrofagi e delle cellule non polarizzate (globuli rossi) (Figura 12).



Figura 12 – Struttura cristallografica della ferroportina.

Essa esporta lo ione ferroso (Fe^{2+}), il quale dovrà essere ossidato allo stato ferrico da una ferrossidasi, necessaria anche per stabilizzare la ferroportina a livello delle membrane, prima che lo ione esportato si leghi alla transferrina. L'importanza della FPN1 è messa in ulteriore evidenza quando la si rapporta all'epcidina poiché il trasportatore è il ligando dell'ormone epatico. L'epcidina si lega alla ferroportina e ne promuove l'internalizzazione mediante la fosforilazione degli aminoacidi posti a livello del loop intracellulare dell'esportatore. Il complesso FPN1 – epcidina viene così internalizzato promuovendo l'ubiquitinazione e la degradazione lisosomiale di entrambe le proteine (65,66). Questo meccanismo è sufficiente per spiegare la regolazione dell'assorbimento di ferro, poiché gli enterociti deputati al suo assorbimento svolgono la loro funzione soltanto per due giorni prima di staccarsi dall'apice dei villi e disperdersi nel lume intestinale. Perciò, il trasporto tramite ferroportina stabilisce se il ferro sia legato alla transferrina o rimosso dall'organismo con gli enterociti persi. Quando le riserve di ferro sono adeguate o in eccesso, il fegato produce l'epcidina che raggiunge l'intestino tenue. Qui, l'epcidina si lega alla ferroportina e ne induce la sua internalizzazione, bloccando in questo modo l'unica via di trasferimento del ferro dall'enterocita al plasma. Quando i livelli di ferro sono bassi, la produzione di epcidina è soppressa e le molecole di ferroportina sono distribuite sulla membrana basolaterale degli enterociti, consentendo il trasporto di ferro verso la transferrina plasmatica (Figura 13). Questo meccanismo di regolazione è importante sia nell'epitelio intestinale, sia nei macrofagi del sistema reticoloendoteliale, dove l'inattivazione della ferroportina interrompe il rilascio di ferro recuperato dai globuli rossi senescenti. Entrambi gli eventi portano al medesimo risultato: diminuzione di ferro sierico.

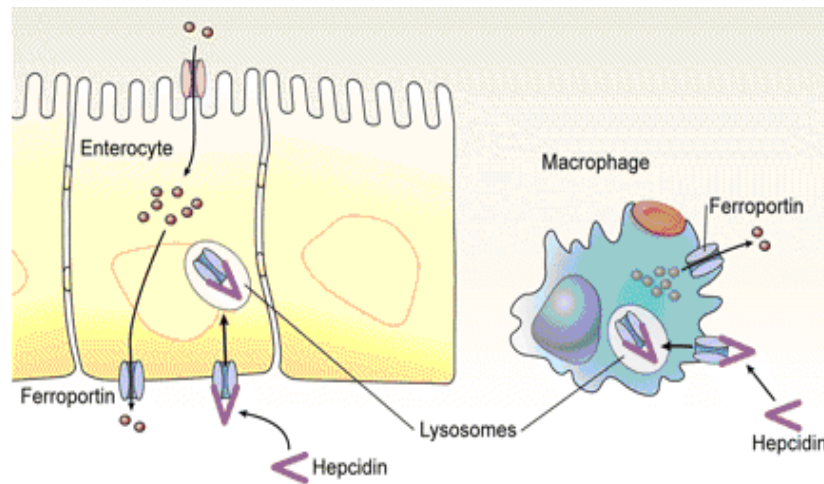


Figura 13 - Interazione tra epcidina e ferroportina.

❖ **REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA FERROPORTINA**

Il ferro è un elemento essenziale per la sopravvivenza degli organismi ed è richiesto per l'attività di molecole coinvolte in una serie di eventi fisiologici cruciali come il trasporto dell'ossigeno, la respirazione mitocondriale e la sintesi del DNA. Però a causa delle proprietà pro-ossidanti del ferro, un suo eccesso risulta dannoso per il DNA, i lipidi e le proteine, portando a morte cellulare e disfunzione tissutale. Nei mammiferi non esiste un pathway secretorio del ferro, ma gli organismi regolano le riserve di ferro nel corpo attraverso la regolazione dell'assorbimento intestinale e l'interazione epcidina-ferroportina (67,68,69). L'espressione della ferroportina è regolata a livello post-trascrizionale attraverso il sistema IRE/IRP (60,61) e a livello post-traduzionale o sistemica dall'azione dell'epcidina. L'mRNA di FPN1 ha l'IRE (iron responsive element) al 5' UTR e la sua espressione è regolata trascrizionalmente dalle proteine IRP1 e IRP2. Alcuni geni coinvolti nel metabolismo del ferro contengono l'IRE al 5' e media la repressione trascrizionale (ferritina e ALAS), mentre altri geni contengono l'IRE al 3' UTR e stabilizza l'mRNA (TfR1 e DMT1). Il sistema IRE/IRP è regolato dallo stato intracellulare del ferro e in particolare è attivato da carenza di ferro. Dall'attività IRE/IRP le cellule recuperano ferro

citosolico attraverso l'azione del TfR e DMT1, contemporaneamente sequestrano ferro attraverso la ferritina e bloccano l'esportazione di ferro attraverso la non sintesi di FPN1.

❖ FERROPORTINA ED ERITROPOIESI

Un adeguato apporto di ferro è importante per avere un'adeguata eritropoiesi, si sa infatti che circa il 70% del ferro presente nell'organismo è incluso nel gruppo eme. D'altra parte bisogna fare molta attenzione che il ferro non si accumuli negli eritroblasti durante il processo di maturazione, causando una tossicità cellulare con conseguente apoptosi (in questo caso emolisi); per questo motivo è necessario che le cellule della linea eritropoietica siano dotate di un esportatore di ferro quale la FPN1.

La scoperta della FPN1 sulla membrana degli eritroblasti è sorprendente in quanto si pensava che queste cellule non avessero bisogno di un ferro esportatore poiché si supponeva che la fuoriuscita cellulare dello ione avvenisse esclusivamente durante il processo di degradazione da parte dei macrofagi. Attualmente si può affermare l'esistenza di due isoforme della ferroportina: quella IRE dipendente: FPN1A e quella non – IRE: FPN1B. Quest'ultima è altamente espressa nel duodeno dove rappresenta il 25% dell'mRNA totale della ferroportina, mentre nel midollo rappresenta il 40% della ferroportina complessiva espressa e meno del 6% negli altri tessuti. Entrambe le isoforme 1A e 1B sono molto espresse negli enterociti e nei precursori eritroidi. La scoperta di FPN1B negli enterociti duodenali spiega il motivo per cui gli enterociti possano continuamente esportare ferro in circolo anche se manca ferro. La presenza di FPN1B nei precursori eritroidi aiuta invece a comprendere il meccanismo di come tali cellule possano sentire i livelli sistemici di ferro e come il differenziamento proceda in sintonia con la quantità di ferro che cambia durante l'eritropoiesi. La quantificazione dei trascritti 1A e 1B rivela che l'isoforma 1B è prevalentemente espressa nella linea eritroide, dove rappresenta

oltre il 60% dei livelli di mRNA della ferroportina. Al contrario i livelli di trascritto della FPN1B sono dieci volte meno nei macrofagi (il 15% dell'mRNA totale della ferroportina). Il promotore di FPN1B è regolato da due fattori trascrizionali, GATA e EKLF, che inoltre sono coinvolti nella regolazione di altri geni eritroidi specifici, inclusi l'emoglobina e il TfR. Ciò suggerisce come l'omeostasi del ferro e la produzione di globuli rossi siano coordinatamente regolati nei precursori eritroidi. Il promotore di FPN1B è espresso in modo specifico nelle cellule duodenali ed eritroidi, mentre il promotore di FPN1A è espresso in modo ubiquitario. I livelli proteici di FPN1 sono maggiori nelle cellule eritroidi e nei macrofagi rispetto alle altre cellule del midollo. Comparando l'espressione di FPN1 con i livelli di proteina si nota come l'mRNA di FPN1B correli con i livelli di proteina solo però nelle cellule eritroidi, non nei macrofagi (70,71). La FPN1A è trascritta ad alti livelli al giorno 0 dell'eritropoiesi normale ma la proteina FPN1 non incrementa con i livelli di trascritto della FPN1A. Dunque i livelli di proteina FPN1 riflettono i livelli di trascritto FPN1B. La FPN1A contribuisce in modo minore alla produzione di ferroportina, mentre la FPN1B è funzionalmente e traduzionalmente più determinante nel generare la proteina ferroportina. Le due isoforme della FPN1 suscitano molto interesse, uno studio recente ha ipotizzato che la funzionalità dell'esportatore, posto sulla membrana degli eritrociti, sia quella di garantire una soppressione parziale dell'eritropoiesi qualora i tessuti non eritropoietici rischino lo sviluppo di ferro deplezione. Ciò spiega perché situazioni caratterizzate da carenza di ferro (anemie) sono le maggiori condizioni che preannunciano la manifestazione di ferro deplezione nei mammiferi (72) (Figura 14).

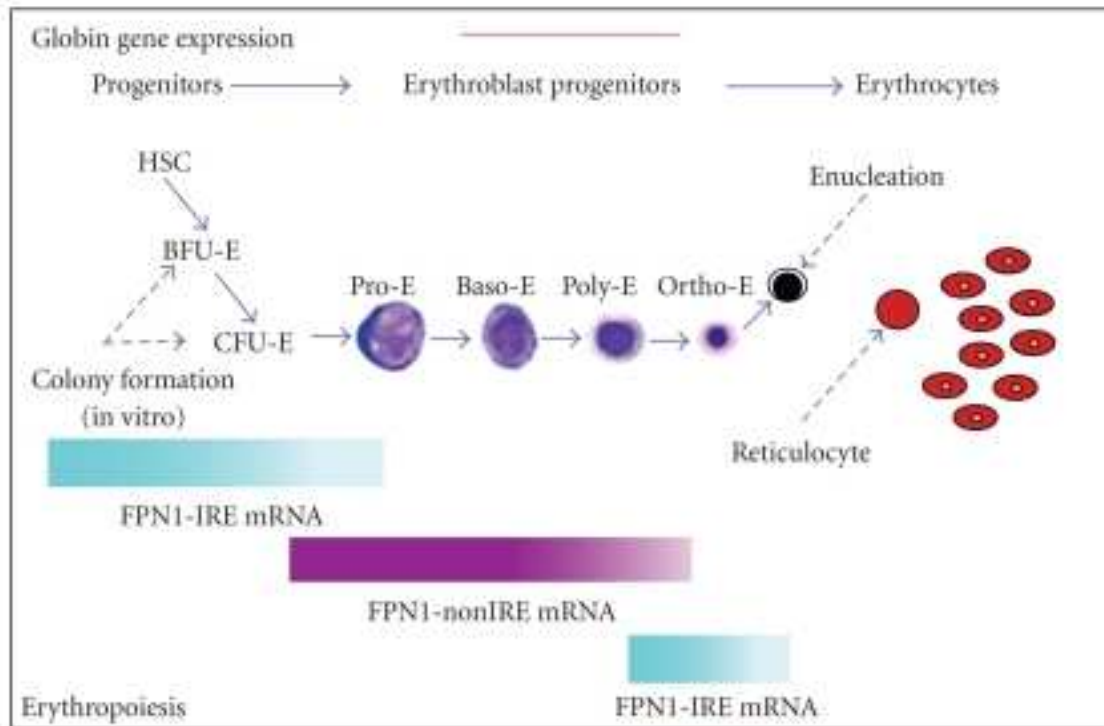


Figura 14 - Espressione della FPN1 durante l'eritropoiesi.

❖ FERROPORTINA E MACROFAGI

La produzione di nuovi eritrociti nel midollo osseo è un processo che richiede l'utilizzo di ferro depositato nel corpo e l'attività eritroide del midollo controlla l'omeostasi del ferro. I macrofagi giocano un ruolo importante nel controllare la biodisponibilità di ferro per l'eritropoiesi. Queste cellule che fagocitano i globuli rossi senescenti (senescent red blood cells RBCs), riciclano circa 20-25 mg di ferro eme, quantità necessaria per la produzione giornaliera di nuovi eritrociti (73). Il legame tra i vecchi globuli rossi con la membrana dei macrofagi porta alla formazione di vescicole fagocitiche che internalizzano gli eritrociti così da poterli degradare. Le molecole di eme rilasciate nel citosol fungono da sensore molecolare per la trascrizione di eme ossigenasi (HO-1) che degrada l'eme, rilascia CO, biliverdina e ferro ferroso (Fe II). A questo punto il ferro liberato può essere stonato con le molecole di ferritina e utilizzato in un secondo momento o esportato fuori dal plasma

tramite ferroportina (FPN). Quale sia il destino dipende dall'affinità del ferro con una di queste due proteine “accettatrici” di ferro. La ferroportina è altamente espressa sulla membrana plasmatica dei macrofagi ma soprattutto sugli enterociti duodenali dove contribuisce all'assorbimento di ferro intestinale. L'espressione di ferroportina in cellule eritroidi è certa ma la sua funzione non è stata ancora chiarita (72). Così come nelle cellule eritroidi anche nei macrofagi la ferroportina è soggetta a due tipi di regolazione: post-trascrizionale da parte del ferro e sistemica da parte dell'epcidina. A livello post-trascrizionale le modificazioni del contenuto di ferro intracellulare sono normalmente rilevate da proteine regolatrici del ferro chiamate IRP1 e IRP2 che, agendo da sensori delle quantità di ferro, regolano la trascrizione di alcuni geni target attraverso il legame con degli elementi responsivi al ferro (IREs) presenti nelle regioni non codificanti dell'mRNA di questi geni. Un incremento di ferro intracellulare induce un cambiamento conformazionale nelle IRPs che così perdono l'affinità di legame con l'IRE e si accende così la trascrizione di geni come la ferritina e la ferroportina. Ultimamente l'importanza delle IRP nel controllare la trascrizione di FPN è stata contestata in quanto l'inattivazione selettiva della IRP2 in macrofagi di topo non hanno provocato significative modificazioni. Ciò fa ipotizzare ad una gestione del ferro nei macrofagi che dipende maggiormente da un signaling a livello sistemico (74). E' stata infine proposta un'ultima regolazione che sembra valere anche per la ferroportina espressa nelle cellule eritroidi, ovvero una regolazione trascrizionale da parte dell'eme. Il processo di eritrofagocitosi, attraverso il pathway mediato dall'eme, induce la sintesi di FPN, HO-1 e ferritina. Infatti, in condizioni di abbondante eme, questo lega il repressore trascrizionale Bach1 che normalmente forma un eterodimero con una proteina chiamata MafK. Quest'ultima non complessata a Bach1 può così legare un elemento di reclutamento Maf (Maf Recognition Element MARE) presente su alcuni geni target inducendone la trascrizione (75). L'eme, in forma di emina o come

emoglobina, attiva in particolare la sintesi di FPN in modo ferro-indipendente (76) (Figura 15).

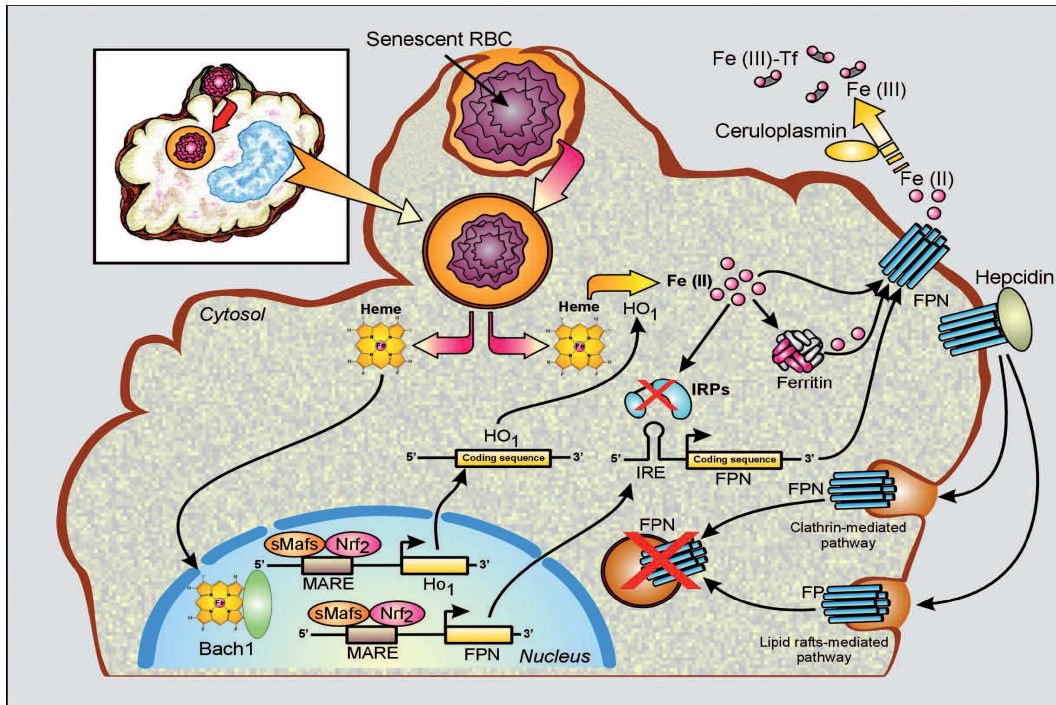


Figura 15 – Meccanismi di azione e regolazione della ferroportina nei macrofagi.

La regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della ferroportina gioca un ruolo importante nel controllare la disponibilità di ferro per l'eritropoiesi e quindi un difetto in uno di questi step della regolazione può contribuire alla comparsa di disordini del ferro. Infatti l'aumento dell'efflusso di ferro dai macrofagi causa una diminuzione dei livelli di epcidina che contribuisce così ad incrementare la saturazione della transferrina e il sovraccarico di ferro nei tessuti. Al contrario, incrementare l'attività del macrofagi con la presenza di elevati livelli nel siero di epcidina, contribuisce a trattenere ferro nei macrofagi e limitare così l'eritropoiesi in malattie da infiammazione cronica (77,78).

❖ **REGOLAZIONE DELL'EPICIDINA DALL'OSSIGENO,
DALL'ANEMIA E DALL'ERITROPOIESI: GDF15 E HIF**

La produzione di epcidina è soppressa da condizioni di anemia, ipossia, ferro deplezione ed eritropoiesi, tutti fenomeni che richiedono ferro per la sintesi di emoglobina. L'anemia dovuta da sanguinamento o dall'emolisi indotta da Fenildrazina causa una diminuzione dei livelli di mRNA dell'ormone (79). Topi esposti per due giorni al trattamento delle camere iperbariche hanno presentato livelli di epcidina più bassi. Questo avviene perché l'anemia e l'aumento dei livelli di ossigeno causano la produzione di eritropoietina (EPO) e determinano un aumento dell'eritropoiesi, fenomeno per cui il ferro diventa indispensabile; per questo motivo i livelli di epcidina devono diminuire per garantire un maggiore apporto di ferro all'organismo (79). Per quanto riguarda l'eritropoiesi e il sistema di riciclo dei globuli rossi senescenti, è importante sottolineare che circa il 65-70% del ferro contenuto nell'organismo lo si ritrova negli eritrociti all'interno dell'emoglobina; di conseguenza, la domanda di ferro da parte dell'organismo è strettamente legata al livello di eritropoiesi (80). A livello molecolare accade che l'eritropoietina scatena un signalling che silenzia l'epcidina mediante l'attivazione di molecole che vanno a posizionarsi sulle regioni antecedenti al promotore del gene HAMP, impedendo ai fattori di trascrizione di legarsi (65). Nel 2008 molti lavori si sono incentrati sullo scopo di trovare una molecola, un fattore specifico per l'eritropoiesi che potesse inibire l'espressione di HAMP. Il gene candidato a questa funzione è il Growth Differentiation Factor 15 (GDF15), un membro della super famiglia del Transforming Growth Factor β , le cui espressione e secrezione sono aumentate durante la maturazione degli eritroblasti (81) (Figura 16). Si pensa che la produzione di GDF15 sia il collegamento tra l'eritropoiesi e la soppressione di epcidina anche se studi recenti mettono in discussione questa correlazione diretta (82).

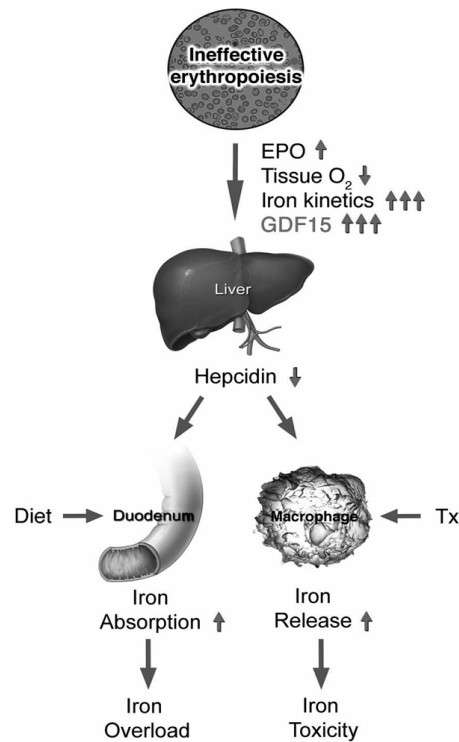


Figura 16 - Conseguenze dell'eritropoiesi inefficace sulla produzione di GDF15 ed epcidina.

❖ GDF15

Il locus del human Trasforming Growth Factor 15 (hGDF15) è stato mappato mediante Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) sul cromosoma 19p12.1-13.1. La struttura del gene del GDF15 è molto semplice in quanto è composto solamente da un introne e da 2 esoni codificanti la proteina (59). Il suo promotore ha dei siti di legame per due fattori di trascrizione: p53 e Sp1/Egr1. GDF15 è una delle proteine maggiormente secrete mediante l'azione di p53: ciò induce a pensare che la citochina sia sensibile a diversi processi quali l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi; si evince quindi che l'espressione di GDF15 dipenda da fattori di trascrizione che possono regolare da una parte una risposta allo stress o all'apoptosi, e dall'altra una risposta al differenziamento tissutale. Ad esempio, se l'ipossia o qualsiasi altro stress cellulare causano un aumento nel siero dei livelli di p53 e Sp1/Egr1, conseguentemente si può osservare un aumento dell'espressione di GDF15 che

riflette, per l'appunto, la situazione di stress (59,83). Il GDF15 è un membro della super famiglia del Trasforming Growth Factor beta (TGF- β) che comprende circa 40 proteine. Questa superfamiglia è coinvolta in una serie di processi quali differenziazione cellulare, sviluppo ed apoptosi; il GDF15 presenta un'omologia di struttura per quanto riguarda il dominio C – rich a tutte le altre citochine, ma differisce da queste per circa il 70% della restante sequenza aminoacidica, conferendogli una struttura pressoché unica all'interno della superfamiglia. Una volta trascritto, il GDF15 presenta le stesse caratteristiche dei membri del TGF – β , esso infatti è un dimero, le due porzioni proteiche sono legate tramite un gruppo disulfidrico. In questo modo il precursore si ritrova legato alla matrice extracellulare in una forma chiamata proGDF15, il taglio a livello della regione RXXR garantisce la produzione dell'estremità C terminale che viene rilasciata nel siero ottenendo così il GDF15 maturo (Figura 17). Il GDF15 è facilmente rilevabile nel sangue dove agisce come un messaggero extracellulare, purtroppo ad oggi sono ancora sconosciuti sia i recettori del GDF15 sia la cascata del signalling che esso produce a livello delle cellule bersaglio (83).

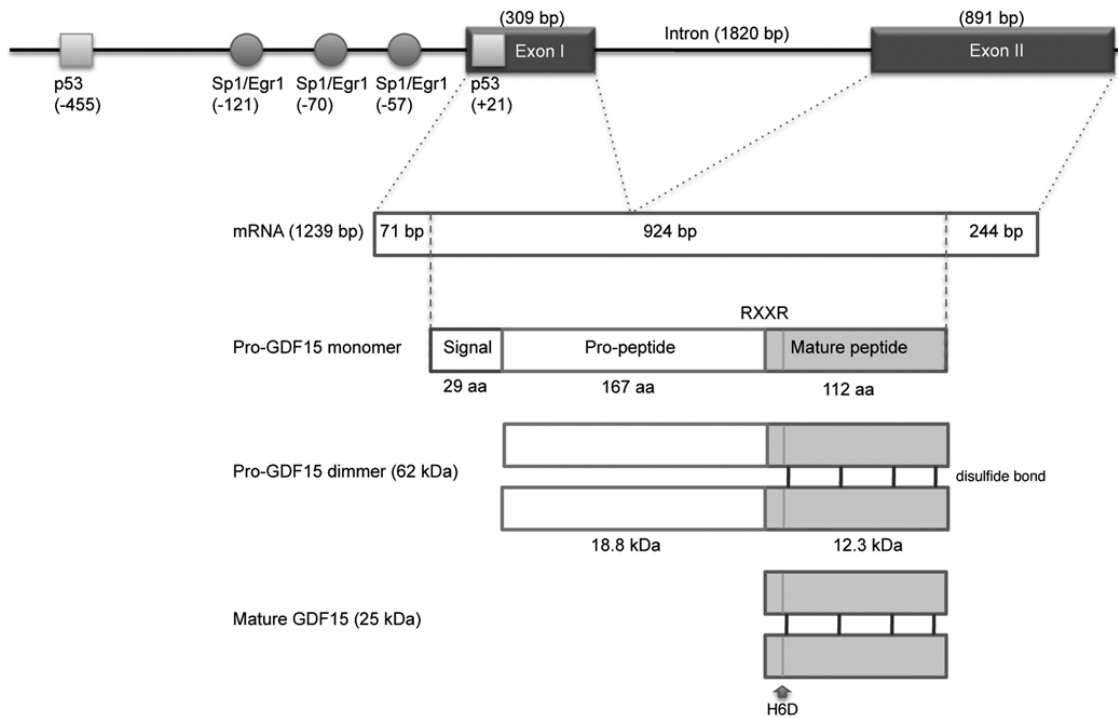


Figura 17 - GDF15: dal gene alla proteina.

❖ HIF

Purtroppo si sa ancora poco riguardo i pathways che regolano l'epcidina in risposta all'ipossia, il maggior candidato a questa regolazione è il fattore ipossia – inducibile (HIF). HIF è un eterodimero la cui espressione è regolata a livello post traduzionale; vi sono 3 subunità regolatorie chiamate HIF - 1 α (responsiva all'ossigeno), HIF - 2 α e HIF - 3 α . In presenza di ossigeno, le subunità regolatorie vengono idrossilate all'altezza di due proline mediante l'azione di una prolil idrossilasi ossigeno e ferro dipendente che le degrada mediante ubiquitinazione. Quando siamo in condizioni di anemia significa che l'organismo non ha globuli rossi sufficienti per garantire il corretto afflusso di ossigeno ai tessuti verificandosi così una situazione di ipossia tissutale, ma non solo, pochi globuli rossi indicano una diminuzione di ferro legato all'eme.

In queste condizioni di ipossia o di ferro deplezione le idrossilasi sono inattive, permettendo così alle subunità di HIF di essere prodotte e di accumularsi nello spazio citoplasmatico, dopodiché traslocheranno nel nucleo, associate alla subunità 1 β (recettore citoplasmatico) ed il complesso eterodimerico formatosi si legherà agli elementi responsivi dell'ipossia (HREs) posti sulla sequenza del gene di interesse. Tutto ciò ha come conseguenza la trascrizione dei geni coinvolti nel controllo del metabolismo, dell'angiogenesi, dello stress cellulare ed apoptosi.

Geni attivati da HIF possono essere classificati in 3 gruppi funzionali. 1) Proteine partecipanti all'eritropoiesi come eritropoietina, transferrina, TfR, eme ossigenasi. 2) Proteine che aumentano la distribuzione di ossigeno ai tessuti. 3) Proteine richieste per garantire l'adattamento del metabolismo cellulare in condizioni di ipossia (47,65) (Figura 18). È stato inoltre osservato che l'aumento dell'espressione di HIF1 garantisce un abbassamento della trascrizione del gene HAMP, sottolineando la correlazione tra ipossia e metabolismo del ferro. La regolazione di epcidina nelle condizioni di ipossia può rivelarsi molto importante per capire l'accumulo di ferro e la sua cattiva distribuzione nelle anemie congenite croniche (67).

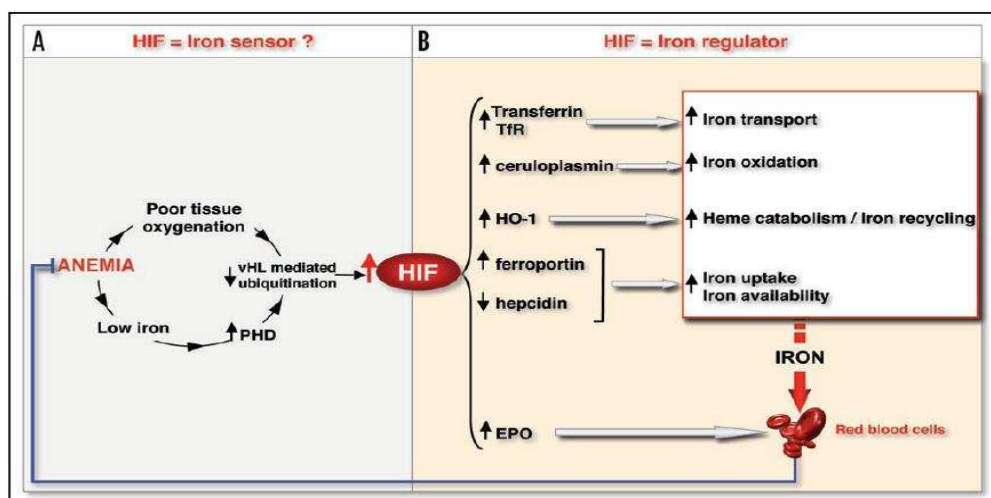


Figura 18 - Azione di HIF nel metabolismo del ferro.

❖ **BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 6**

Le BMPs fanno parte della grande superfamiglia del TGF – β ; sono dei fattori solubili, autocrini o paracrini, che garantiscono il signalling attraverso recettori eterogenei posti sulla superficie cellulare. Il legame delle BMPs ad un co – recettore facilita l'interazione con il recettore BMP di tipo I che a sua volta entra in contatto con un recettore BMP di tipo II il quale possiede dei siti per l'attività treonin o serin kinasica. La fosforilazione del recettore di tipo I garantisce l'inizio della cascata di trasduzione del segnale avente come fine ultimo l'attivazione dei peptidi SMAD 1-5-8 (Sons of Mothers Against Decapentaplegic Homologue), fattori di trascrizione che, una volta attivati, si legano formando un complesso con SMAD 4 e traslocano nel nucleo per stimolare la trascrizione dei geni aventi le regioni responsive alle BMPs (BREs) alle quali il complesso SMAD si lega (65,84,85). Tra le varie BMPs, l'isoforma 6 è quella che risulta responsiva ai livelli di ferro: come l'epcidina, il suo mRNA aumenta con l'aumentare di ferro e viceversa; si ipotizza così che la BMP6 ha un ruolo preponderante nell'attivazione del signalling coinvolgente le SMAD garantendo un aumento di trascrizione del gene HAMP in vivo. Ulteriore supporto a queste informazioni è l'osservazione dell'aumento di espressione di BMP6 sulla superficie dell'epatocita in corrispondenza ad una dieta ricca di ferro (86) (Figura 19). L'inibizione dell'azione delle BMPs è causata dall'interazione di queste ultime con la porzione solubile dell'emojuvelina.

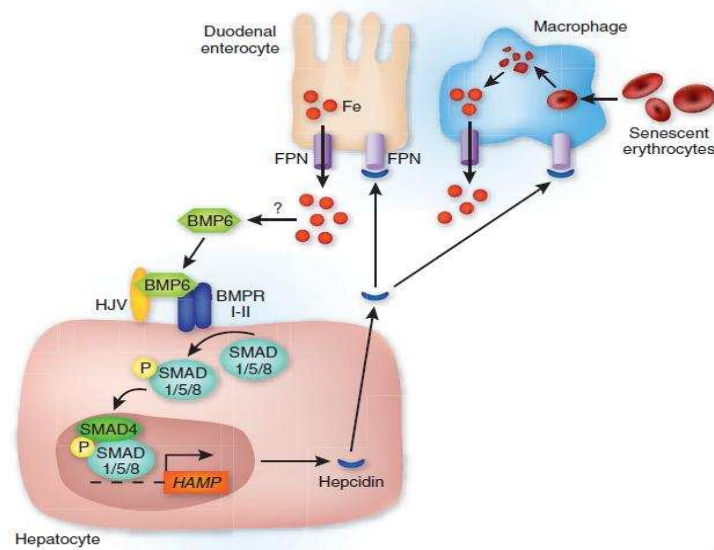


Figura 19 - Azione di BMP6 sulla superficie dell'epatocita.

❖ EMOJUVELINA (HJV)

L'HJV è una proteina che si trova sulla superficie delle cellule del muscolo scheletrico, cardiaco e sulla membrana degli epatociti. La sua localizzazione sulla superficie cellulare è resa possibile grazie ad un legame mediato da un glicosilfosfatidil inositolo. Pazienti aventi mutazioni nel gene dell'HJV presentano bassi livelli di epcidina con conseguente sovraccarico di ferro, portando a ritenere che la proteina possa essere un importante modulatore dell'espressione di epcidina. Si è scoperto inoltre che l'emojuvelina non è presente solo come proteina legata alle membrane, ma vi è anche una forma solubile (sHJV) generata dall'azione di furine che tagliano a livello dei siti specifici la forma ancorata alla membrana (87,88).

Il ruolo principale dell'emojuvelina legata alla membrana (mHJV) è stato chiarito quando vi è stata la scoperta che essa fungeva da co – recettore per le BMPs; infatti la m-HJV amplifica lo stimolo scatenato dalle BMP2 e BMP4: queste BMPs sono sensibili alla olotransferrina (transferrina saturata) e si legano ai loro recettori sulla cellula epatica; l'interazione tra HJV/BMPs è risultata necessaria per garantire il signalling per

l'attivazione trascrizionale di HAMP. Questa funzione è stata confermata dallo studio di mutazioni dell'HJV, le quali causano una emocromatosi giovanile in quanto la proteina non è più presente sulla membrana plasmatica e quindi non riesce ad interagire con le BMPs e i loro recettori, impedendo così una up – regolazione della sintesi di epcidina (87,88). L'isoforma solubile invece è un componente inibitorio del pathway per l'epcidina. La sua produzione è legata alla condizione di ferro deplezione e di ipossia; in condizioni di carenza di ferro e di ossigeno vi è un aumento della produzione di furina, proteina in grado di clivare l'isoforma mHJV generando così alte concentrazioni di sHJV, le quali vanno a competere con l'isoforma di membrana per il sito di legame sul recettore BMP che rimane così privo del suo ligando. In questo modo non si verifica il signalling responsabile dell'attivazione del gene HAMP, avendo come risultato l'abbassamento di produzione di epcidina (80,88,89) (Figura 20). Poco si sa invece della sua funzionalità in condizioni fisiologiche.

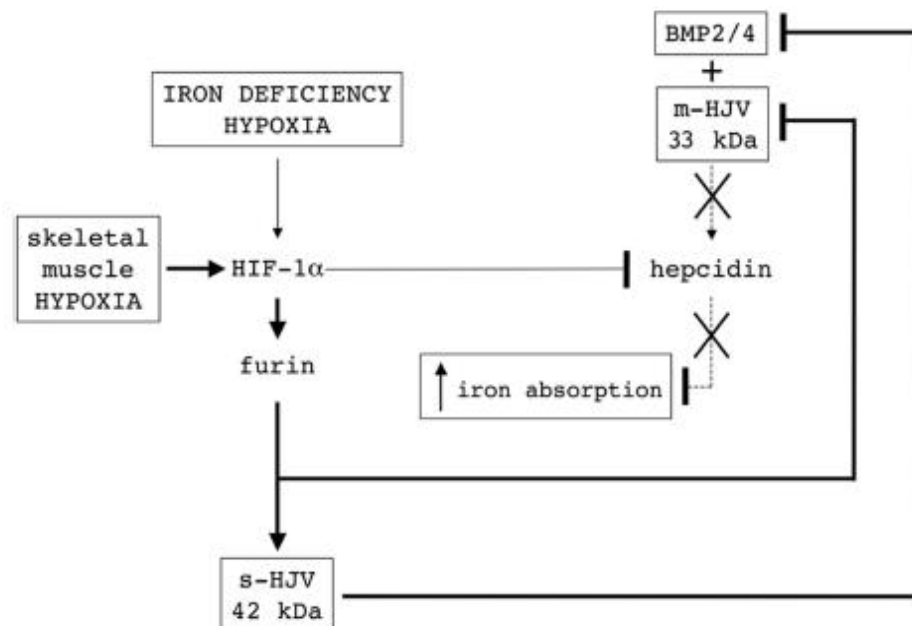


Figura 20 - Schema dell'omeostasi del ferro e della regolazione di epcidina in ipossia.

❖ MATRIPTASI 2 (TMPRSS6)

La matriptasi è una serina proteasi plasmatica di tipo II, membro della famiglia degli enzimi proteolitici di membrana. Questa proteasi è altamente conservata nell'uomo, nel topo e nel ratto ed è altamente espressa a livello del fegato. La proteina ha 811 aminoacidi che costituiscono una coda citoplasmatica all'N – terminale, un dominio transmembrana, un dominio responsivo al riconoscimento delle BMPs (CUB) e un dominio extra cellulare al C – terminale ove vi è posta l'attività proteasica (87,90) (Figura 21).

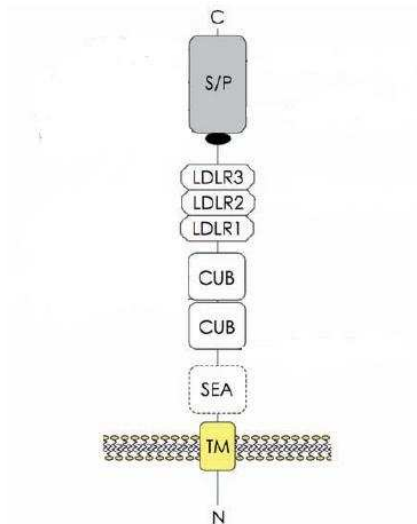


Figura 21 - Schematica rappresentazione della matriptasi.

Studi sulla funzionalità della matriptasi hanno dimostrato che l'attività serin proteasica nel dominio extracellulare sia fondamentale per il controllo dell'attivazione del pathway di trascrizione del gene HAMP. Purtroppo poco si sa riguardo al ruolo della matriptasi – 2; è stato ipotizzato che essa sia sensibile alle concentrazioni di ferro legato alla Tf, e che sia attiva in caso di aumento dei livelli in circolo dello ione. Studi condotti sulla proteina sono arrivati alla conclusione che essa possa o degradare un attivatore (grazie all'attività proteasica) oppure possa garantire l'aumento dell'espressione di un inibitore della

trascrizione del gene HAMP. Si pensa inoltre che il meccanismo d'azione di *TMPRSS6* agisca sul complesso SMAD 1-5-8 impedendo ad esso di legarsi a SMAD4 rendendo così impossibile la traslocazione del complesso nel nucleo (87) (Figura 22). Ulteriori informazioni derivano dallo studio di topi transgenici denominati *Mask*, i quali non esprimono la *TMPRSS6*. Questi topi sono affetti da anemia refrattaria caratterizzata da carenza di ferro (*IRIDA*) e presentano altissimi livelli di epidina con conseguente ferro deplezione. Da ciò si evince che la matriptasi – 2 sia una proteina che garantisce il blocco della trascrizione del gene HAMP, in questo non avviene in maniera diretta bensì attraverso il taglio della mHJV (90).

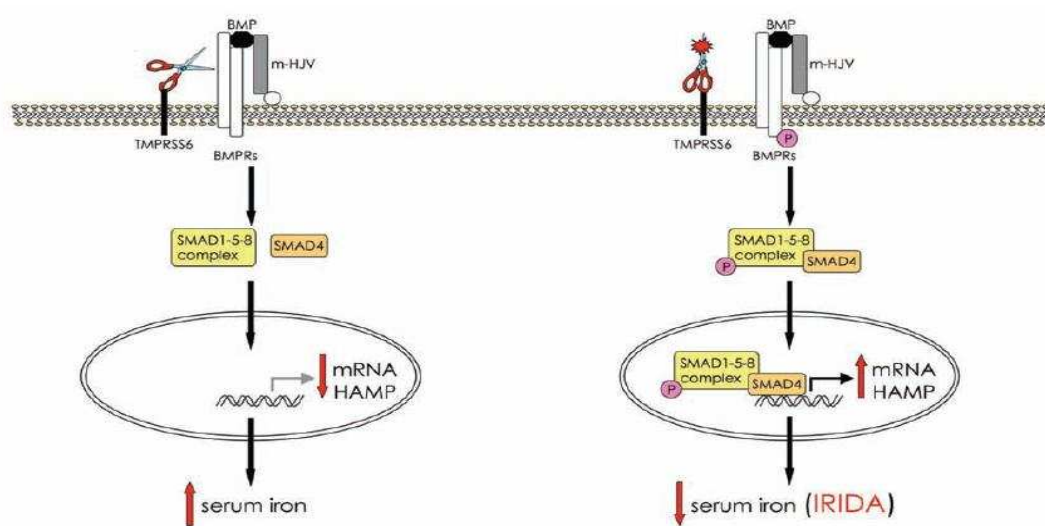


Figura 22 - Azione della matriptasi a seconda della disponibilità di ferro.

❖ **EMOCROMATOSI EREDITARIA (HH)**

La malattia è caratterizzata da sovraccarico di ferro nelle cellule parenchimali di diversi tessuti, accumulo dovuto sia all'aumento dell'assorbimento intestinale dello ione, sia a causa del suo rilascio da parte dei macrofagi e dalle cellule reticoloendoteliali. L'HH è geneticamente eterogenea: studi di genetica molecolare hanno fornito informazioni su nuove proteine implicate nella regolazione del ferro. I geni noti al momento sono: HFE, (Human Hemocromatosis Protein) responsabile della forma classica o di tipo 1 (91), TFR2, mutato nella forma di tipo 3 ed hepcidina, mutata in un tipo di forma giovanile (92). L'HH HFE-correlata è una malattia che insorge in età adulta, a penetranza incompleta, che colpisce prevalentemente i maschi verso i 40-50 anni. Può causare cirrosi epatica, cardiomiopatie, diabete, ipogonadismo ed altre endocrinopatie, artropatie e pigmentazione cutanea (93). Essa è dovuta a mutazioni di HFE. Due genotipi prevalgono tra i pazienti: omozigosi o eterozigosi composta di C282Y con H63D. L'HH di tipo 2 è definita anche "giovanile" perché i sintomi compaiono più precocemente, il grado di sovraccarico è maggiore e colpisce entrambi i sessi. La maggior parte dei pazienti ha mutazioni in un gene mappato sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q) (91 92) ed identificato di recente (94). Questo gene codifica la proteina hepcidina, espressa prevalentemente a livello epatico e cardiaco, il cui ruolo funzionale rimane tuttavia oscuro. Le mutazioni descritte sono in genere private; una mutazione ricorrente è G320V. L'HH di tipo 3 è dovuta a mutazioni di TFR2, un recettore della transferrina poco noto, espresso a livello epatico, con possibile funzione regolatoria. La malattia presenta aspetti intermedi tra tipo 1 e 2: il quadro clinico è meno grave rispetto al tipo 2, ma il sovraccarico è già presente nei primi anni di vita. L'HH di tipo 4 è una forma dominante di sovraccarico di ferro dovuta a mutazioni nel gene SLC40A1, che codifica la ferroportina 1 (95).

La proteina HFE viene codificata dall'omonimo gene situato sul cromosoma 6; HFE è una proteina di membrana simile al complesso MHC di classe I ed è associata alla $\beta - 2$ microglobulina, è espressa a bassi livelli nella maggior parte dei tessuti, mentre è fortemente presente sulla superficie delle cellule epatiche, sede della sintesi dell'epidina. Si pensa che la funzione di HFE sia quella di regolare l'assorbimento di ferro intervenendo sull'interazione tra il TfR1 ed il suo ligando, ovvero la transferrina. Come avviene questa interazione? Si è osservato che la proteina HFE interagisce con il recettore per la transferrina 1 sovrapponendosi al sito di legame per la transferrina. Quest'ultima è in grado di scalzare HFE dal suo sito di legame grazie all'alta affinità che ha con il suo recettore, in questo modo HFE si trova libera sulla membrana ed è in grado di scatenare il signalling per una positiva sintesi di epidina (Figura 23).

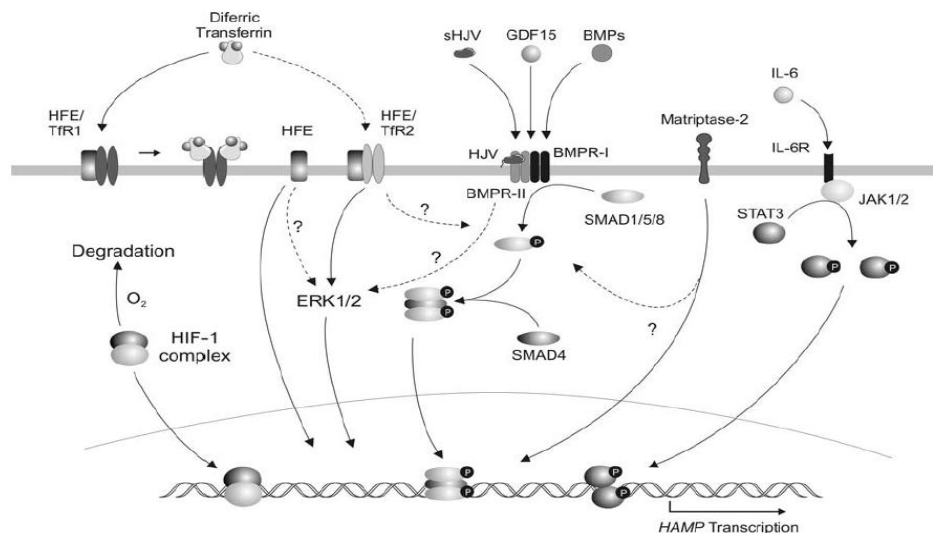


Figura 23 - Signalling scatenato da HFE posto sulla superficie dell'epatocita.

A supporto di questa teoria sono stati generati dei topi transgenici per il legame tra HFE e TfR1 che rimane altamente stabile e costitutivo anche in presenza di transferrina saturata; in questi topi si ha una produzione bassissima di epidina dovuta alla mancata disponibilità

di HFE sulla membrana dell'epatocita con la conseguente assenza del signalling per la trascrizione del gene HAMP.

La stessa interazione la si può osservare anche con l'isoforma 2 del recettore per la transferrina, infatti quando HFE e Tfr2 sono over espressi sulla superficie della medesima cellula, essi sono in grado di interagire. HFE si sovrappone al sito di legame per la Tf posto sull'isoforma 2 del recettore; la Tf scalza HFE legandosi al recettore e in questo modo Tfr2 e HFE innescano una cascata del segnale ERK1/ERK2 p58/MAP kinasi dipendente andando a stimolare la trascrizione di epcidina (96) (Figura 24).

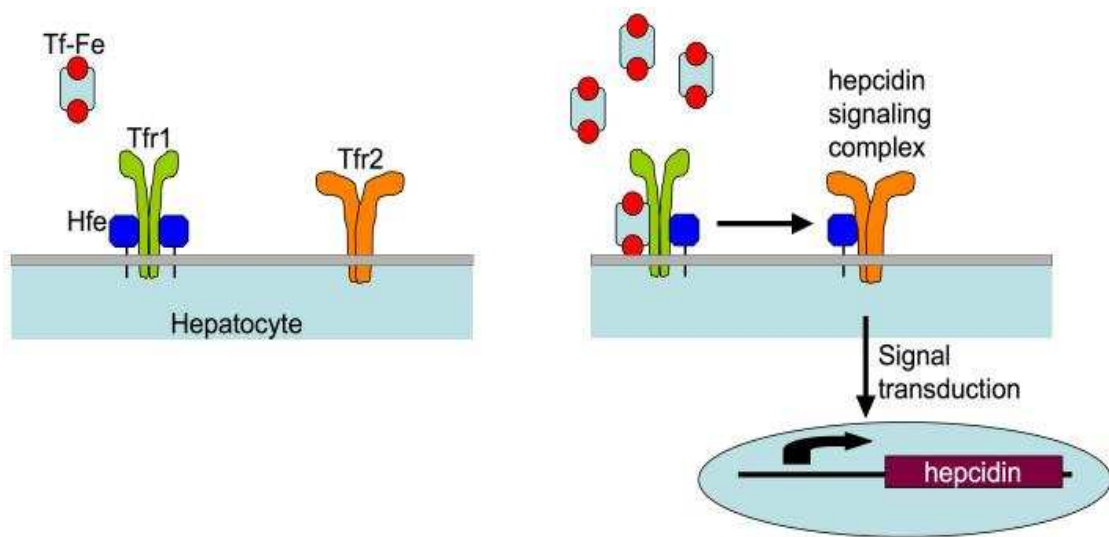


Figura 24 - L'azione di HFE dipende dalla concentrazione di ferro.

Per quanto riguarda lo studio della regolazione a livello molecolare del gene HAMP, c'è da dire che i fattori responsabili di questa regolazione sono stati studiati singolarmente. In vivo abbiamo una situazione diversa, dove questi fattori interagiscono l'uno con l'altro a diversi livelli del signalling per garantire la regolazione del gene epatico.

❖ ANEMIE DA SOVRACCARICO DI FERRO: CDA E β -TALASSEMIE

Le anemie diseritropoietiche congenite (CDA) comprendono un gruppo di rari disordini ereditari caratterizzati da anomalie morfologiche eritroblastiche, eritropoiesi inefficace e sovraccarico di ferro. Le CDA sono ulteriormente suddivise in due gruppi: CDAI e CDAII le quali sono le più frequenti. I due gruppi di CDA differiscono rispetto alle mutazioni responsabili della malattia ed alle caratteristiche morfologiche degli eritroblasti: i pazienti affetti da CDAI presentano mutazioni del gene CDAN1 e gli eritroblasti a livello del midollo osseo mostrano un'eterocromatina spugnosa. I pazienti affetti da CDAII presentano la mutazione del gene COPII il quale causa la formazione di eritroblasti bi o tri – nucleati, nei quali si osserva la deglicosilazione di proteine e lipidi e il reticolo endoplasmatico forma delle doppie membrane (97). Casanovas ha dimostrato in uno studio pubblicato quest'anno, che i livelli di epcidina nel siero dei pazienti affetti da CDA non sono diminuiti rispetto quelli misurati nei controlli sani. L'autore afferma che per poter confrontare le concentrazioni di epcidina tra soggetti CDA e sani, non bisogna osservarne i livelli nel siero, ma è necessario rapportarla alla ferritina; così facendo, si nota una diminuzione di questo rapporto nei pazienti CDA rispetto ai controlli. In questo modo si può confermare che le concentrazioni del peptide epatico sono estremamente basse nel siero dei pazienti. Studi recenti hanno espresso l'ipotesi che l'eritropoiesi inefficace possa inibire l'espressione di epcidina attraverso un meccanismo che finora resta sconosciuto. Sono state portate avanti molte ipotesi riguardo il legame tra eritropoiesi inefficace, inibizione di epcidina e sovraccarico di ferro; importanti modelli di malattie umane utili per lo studio di questa correlazione sono le β – talassemie.

CAPITOLO 2: LE SINDROMI TALASSEMICHE

Le talassemie rappresentano un gruppo eterogeneo di alterazioni mendeliane, caratterizzate da una mancata, o diminuita, sintesi della catena α o della catena β della emoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) (98). Sulla base della catena mancante si distinguono α -talassemie e β -talassemie. Le talassemie costituiscono uno dei disordini genetici più diffusi nel mondo con un numero stimato di portatori superiore a 270 milioni e più di 350.000 persone affette; ne risultano particolarmente colpite le popolazioni del bacino del Mediterraneo, dell’Africa, dell’India e dell’Oriente. In Italia prevalgono le forme di β -talassemia, che risulta endemica nel delta padano, in Puglia, Calabria, Sicilia e Sardegna (99).

❖ LA β - TALASSEMIA

La β -talassemia è caratterizzata da una deficiente sintesi delle catene β , mentre la sintesi di catene α rimane inalterata. L’alterata produzione di catene β è dovuta alla presenza di mutazioni puntiformi o di piccole delezioni a livello del cluster β globinico posto sul cromosoma 11. Tali mutazioni possono causare una mancata o ridotta sintesi di catene β ; si parla rispettivamente di β^0 -talassemie e di β^+ -talassemie (98,100). Genotipicamente le β -talassemie sono molto eterogenee; ad oggi sono note oltre 200 mutazioni del gene beta globinico che causano un deficit parziale (α^+ o β^{++}) o totale (β^0) di sintesi della catena globinica beta. Sono stati identificati difetti di trascrizione, di maturazione e di traduzione dell’ RNA messaggero. I difetti da delezione del gene beta globinico sono rari e limitati a sporadiche famiglie. Ecco un elenco dei principali difetti di espressione del gene beta globinico:

- **Difetti di trascrizione:** nella maggior parte dei casi si tratta di mutazioni puntiformi della regione del promotore, all’estremità 5’ del gene. Semplici

sostituzioni nucleotidiche sono in grado di ridurre del 30-50% la trascrizione del gene beta e vengono definite mutazioni β^+ in quanto vi è un'attività residua di trascrizione. Il fenotipo ematologico è molto lieve, talvolta completamente silente. Sono stati descritti pochi casi di piccole delezioni al 5' del gene responsabili di completa inattivazione del processo di trascrizione. In questo caso i difetti vengono definiti β^0 .

- **Difetti di maturazione dell' RNA messaggero:**

- *Alterazioni dello splicing:* circa metà delle mutazioni talassemiche rientrano in questo gruppo. Perché lo splicing avvenga correttamente è necessaria, alla giunzione tra introni ed esoni, la presenza di 2 coppie di dinucleotidi invariati: GT all'estremità 5' e AG al 3' dell'introne. Mutazioni introniche possono annullare un sito normale di splicing distruggendo uno dei due nucleotidi invariati. In Italia le più frequenti mutazioni di questo tipo sono IVSI – 1 G/A e IVSII-1 G/A entrambe β^0 . Sono note anche mutazioni che riducono l'efficienza di splicing alterandone la sua sequenza consenso: tra queste la più frequente in Italia è la IVSI – 6 T/C che, lasciando un'attività residua, viene definita mutazione β^+ . In questo contesto altre mutazioni β^+ (con attività residua bassa) sono quelle che creano un altro sito di splicing producendo i di nucleotidi GT o AG in un sito criptico che compete quello normale. Le più comuni in Italia sono la mutazione IVSI – 110 e la IVSII – 745.
- *Mutazioni nel sito di taglio e della poliadenilazione del pre-RNA:* nel processo di maturazione del trascritto primario dell' RNA-messaggero, o pre-RNA, è importante il taglio della parte terminale in corrispondenza della sequenza AATAAA e l'aggiunta di una coda di residui di acido adenilico (poli-A) i quali accrescono la velocità di traduzione e la stabilità dell' RNA messaggero. Se la sequenza AATAAA è mutata, i due processi si verificano molto più a valle

producendo RNA messaggeri più lunghi ed instabili. Queste mutazioni determinano difetti di tipo β^+ .

- **Difetti di traduzione del RNA messaggero:**

- *Mutazioni nel codone di inizio della traduzione:* danno tutte origine a difetti di tipo β^0 e sono mutazioni sporadiche.

- *Mutazioni non senso:* consistono nella sostituzione di una base purinica nel codone dell' RNA codificante, che dà luogo alla formazione di un codone di stop con conseguente arresto della traduzione del messaggero. La mutazione più diffusa è la β^{039} (o cod39).

- *Mutazioni frameshift:* si tratta di inserzioni o delezioni nel DNA di uno o più nucleotidi che causano uno slittamento della cornice di lettura dell' RNA messaggero e quindi un arresto più o meno precoce della traduzione. Se lo slittamento inizia in un codone lontano da quello di termine, la catena sintetizzata avrà una sequenza aminoacidica alterata e sarà più corta del normale. Se invece la mutazione è situata in una regione più vicina alla fine della traduzione, questa continuerà fino ad incontrare un nuovo codone di stop producendo una catena globinica allungata. In ogni caso mancano catene globiniche normali, configurando così difetti di tipo β^0 .

- **Mutazioni che determinano instabilità della catena beta globinica:** si tratta di mutazioni non senso, frameshift o delezioni a livello dell'esone 3. Generano catene allungate (raramente sono tronche) fortemente instabili che precipitano prima di formare i tetrameri con le catene alfa. Queste mutazioni vengono ritenute dominanti in quanto, pur in eterozigosi, causano quadri clinici rilevanti (talassemia intermedia) (101).

Le talassemie associate a questo genotipo β^0/β^0 o β^0/β^+ sono definite **Major** poiché presentano un quadro clinico molto più grave rispetto a quadri più eterogenei e più lievi definiti come talassemie **Intermedie**.

La descrizione e caratterizzazione delle diverse forme di talassemia tuttavia è basata più sulla severità della clinica che non sul tipo di mutazione presente. L'espressione fenotipica delle β talassemie varia da un quadro clinico pressoché normale con un rapporto globinico minimamente sbilanciato (talassemia minor) a situazioni di grave anemia associate a un genotipo β^0/β^0 o β^0/β^+ (talassemia major). Gli omozigoti β^0 così come i doppi eterozigoti $\beta^0\beta^+$ e molti omozigoti β^+ sviluppano un quadro clinico di talassemia major che si manifesta già nella prima infanzia con anemia grave trasfusione dipendente. Con il termine "talassemia intermedia" si definiscono invece casi genotipicamente eterogenei caratterizzati da un quadro clinico più moderato a esordio tardivo e assenza di fabbisogno trasfusionale almeno per lunghi periodi (102).

❖ **TALASSEMIA MAJOR**

Le manifestazioni cliniche della talassemia major (TM) tipicamente si presentano nel primo anno di vita. Il genotipo è caratterizzato dalla scarsa presenza o totale assenza delle catene globiniche beta, mentre la produzione delle catene alfa rimane inalterata. Nei soggetti affetti da talassemia, l'eritropoiesi risulta gravemente modificata poiché i globuli rossi non arriveranno mai a maturazione a causa dell'accumulo delle catene alfa globiniche le quali si complessano al gruppo eme andando a formare gli emicromi o Heinz body. Dal punto di vista maturativo, si è allo step intermedio della differenziazione eritrocitica (giorno 7), dove si ha un'abbondanza di eritroblasti policromatofili che verranno degradati tramite un fenomeno chiamato emolisi intramidollare: gli emicromi precipitano a livello della membrana di questi eritroblasti privi di emoglobina causandone delle gravi

modificazioni incompatibili con la sopravvivenza della cellula, la quale viene eliminata. Fenotipicamente i soggetti TM presentano un'anemia grave cronica, accompagnata da un'ipossia tissutale, che può essere curata solo esclusivamente mediante trasfusioni, tant'è che la talassemia major viene descritta anche come trasfusione dipendente. Le continue trasfusioni servono per sopperire alla mancanza dei globuli rossi a livello periferico e l'eritropoiesi in questi pazienti è pressoché assente (103,104) (Figura 25). Il problema dell'anemia però è molto più complesso, tant'è che non si risolve soltanto con le trasfusioni. In situazioni di anemia si osserva la stimolazione della produzione di eritropoietina (EPO) nel tentativo di aumentare l'eritropoiesi midollare (fino a 25-30 volte i livelli fisiologici) inutilmente, infatti è impossibile poter ripristinare una situazione fisiologica in quanto vi sono le anomalie genetiche delle catene globiniche causanti l'assenza o la diminuita produzione dell'emoglobina negli eritrociti, che rendono impossibile lo svolgimento ottimale dell'eritropoiesi. Purtroppo la strategia delle trasfusioni può essere sì una soluzione per l'anemia cronica, ma porta allo sviluppo di un ulteriore problema: il sovraccarico di ferro. Riprendendo ciò che è stato detto nel primo capitolo, si è osservato che l'epcidina viene silenziata da situazioni di ipossia e da eritropoiesi inefficace, questa inibizione dell'ormone epatico la si riscontra nei quadri talassemici intermedi, si assiste così ad un sovraccarico marziale dovuto all'incremento dell'assorbimento intestinale e all'eritropoiesi inefficace; per quanto riguarda i quadri talassemici major i livelli di epcidina non sono influenzati dall'apporto di ferro dato dalle trasfusioni in quanto è ferro esogeno. Questo sovraccarico porta alla totale saturazione della transferrina e alla comparsa del ferro libero non legato alla transferrina (NTBI) il quale si accumula nei tessuti cardiaci e degli organi endocrini causando una grave tossicità se non trattato farmacologicamente (104).

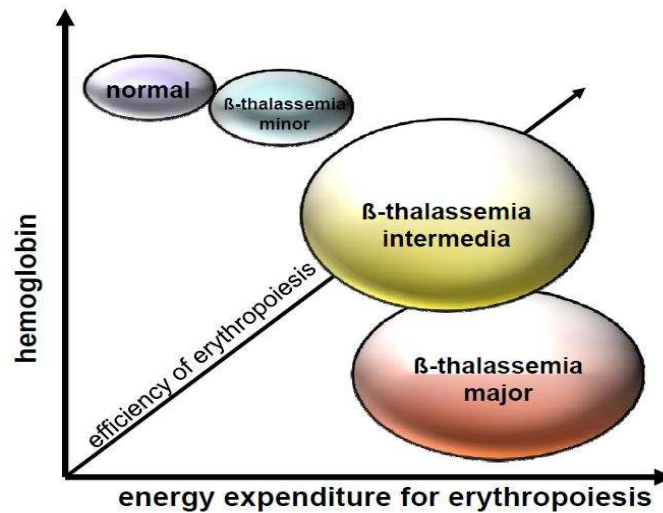


Figura 25 – Eritropoiesi nella talassemia.

❖ LA TERAPIA DELLA β – TALASSEMIA

Il cardine della terapia dei soggetti talassemici sottoposti a regime trasfusionale è rappresentato pertanto dalla terapia ferro chelante con deferoxamina o con i più recenti chelanti orali: deferiprone e deferasirox. Con il termine chelazione si indica una reazione chimica in cui solitamente un atomo metallico, comportandosi da acido di Lewis, viene legato da un reagente detto chelante tramite più di un legame coordinativo. La struttura del composto risultante costituisce un particolare complesso molto stabile che vede l'atomo centrale circondato a tenaglia dal chelante, come se fosse stretto tra le chele di un granchio (da cui il termine chelazione). Una volta chelato, il metallo perde le sue caratteristiche (e quindi nel caso perde la tossicità) per poi venire eliminato legato assieme al chelante tramite le vie urinarie. I chelanti più diffusi nella terapia delle talassemie sono: la desferoxamina (nome commerciale del farmaco: Desferal) che viene somministrata per via endovenosa, oppure i chelanti orali quali deferiprone e deferasirox. La deferoxamina (DFO) forma complessi prevalentemente con gli ioni di Fe trivalenti. L'affinità della DFO per gli ioni bivalenti come Fe^{2+} è sostanzialmente minore. La chelazione avviene con

rapporto molare 1:1, vale a dire che 1 g di DFO può teoricamente legare 85 mg di ferro trivalente. Grazie alle sue proprietà chelanti, la DFO può legare il ferro libero sia quello nel plasma che nelle cellule, formando il complesso ferriossamina (FO). L'escrezione urinaria di FO deriva soprattutto dal turnover del ferro plasmatico, mentre il ferro presente nelle feci riflette soprattutto la chelazione intraepatica. Il ferro può essere chelato dalla ferritina e dall'emosiderina, ma è relativamente basso a concentrazioni di DFO clinicamente rilevanti. La DFO non mobilizza, però, il ferro contenuto nella transferrina, nell'emoglobina od in altre sostanze contenenti un gruppo eme. Altre terapie alternative per la β - talassemia comprendono nei soggetti di età pediatrica il trapianto di midollo osseo da donatore familiare HLA-identico che ha consentito di ottenere una guarigione nell'80% dei casi (100). Sebbene il trapianto possa permettere la risoluzione della malattia, esso può non avere successo e può portare a complicanze (GvHD, alterazioni della crescita o complicanze neurologiche). A tutt'oggi il trapianto è considerato appropriato solo per i pazienti con un donatore HLA identico, quindi per il 30-40% di tutti i pazienti β -talassemici (105). Nuove terapie sperimentali comprendono la terapia genica e l'induzione di emoglobina fetale (HbF). Il trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche corrette con vettori contenenti il gene β -globinico rappresenta la base della terapia genica delle β -talassemie. Negli ultimi anni sono stati effettuati numerosi studi su colture in vitro di cellule staminali CD34+ derivate da pazienti con talassemia major trattate con vettori lentivirali e su modelli murini di β -talassemia; tutti hanno dato risultati promettenti fornendo così un solido razionale per l'applicazione clinica (106). Nonostante queste prime osservazioni, occorrono ancora molti studi perché si possa considerare la terapia genica come la soluzione definitiva della β -talassemia.

❖ **TALASSEMIA INTERMEDIA**

Il fenotipo clinico della talassemia intermedia (TI) è estremamente eterogeneo ed è intermedio tra quello della talassemia major e minor, sebbene ci siano numerose caratteristiche in comune tra le tre condizioni. Alcuni pazienti sono completamente asintomatici fino alla vita adulta e presentano solo una modesta anemia; questi pazienti richiedono solo occasionali trasfusioni al bisogno. Altri pazienti invece presentano una anemia grave che si manifesta tra i 2 e i 6 anni e, sebbene siano in grado di sopravvivere senza un regolare regime trasfusionale, presentano alterazioni della crescita e dello sviluppo (106,107). Tre fattori sono responsabili delle sequele cliniche della TI: eritropoiesi inefficace, anemia cronica e sovraccarico di ferro. A differenza delle TM, le talassemie intermedie hanno un accumulo di ferro dovuto all'assorbimento intestinale (108). Da non dimenticare che la severità della clinica dipende soprattutto dai sottostanti difetti molecolari che causano l'eritropoiesi inefficace ed il sovraccarico di ferro.

❖ **L'ERITROPOIESI INEFFICACE**

L'eritropoiesi è un processo fisiologico mediante il quale, nel midollo osseo, si generano eritrociti maturi a partire dai loro precursori eritroidi CD34⁺. L'eritropoietina (EPO) è il maggior regolatore di questo processo e il suo rilascio da parte del rene è determinato da situazioni quali ipossia e ferro deplezione. Qui si può trovare una prima correlazione tra eritropoiesi ed epacina: la sintesi di globuli rossi avviene se l'ormone epatico non è funzionante. In situazioni patologiche come quelle talassemiche si assiste al fenomeno dell'eritropoiesi inefficace (Figura 26). Nella beta talassemia l'eritropoiesi inefficace è caratterizzata dall'espansione, dalla scarsa differenziazione e dalla morte prematura dei precursori eritroidi attraverso un processo mediato da fattori coinvolti nel ciclo cellulare, nel ferro intake e nella sintesi dell'eme (109).

Nella TM si ha un apporto di eritrociti mediante trasfusioni che causa il quasi completo silenziamento dell'apparato eritropoietico del paziente, per questo motivo la talassemia major non è un ottimo modello per studiare l'eritropoiesi inefficace. Lo è invece la talassemia intermedia che, essendo indipendente dalle trasfusioni, permette un miglior studio del fenomeno.

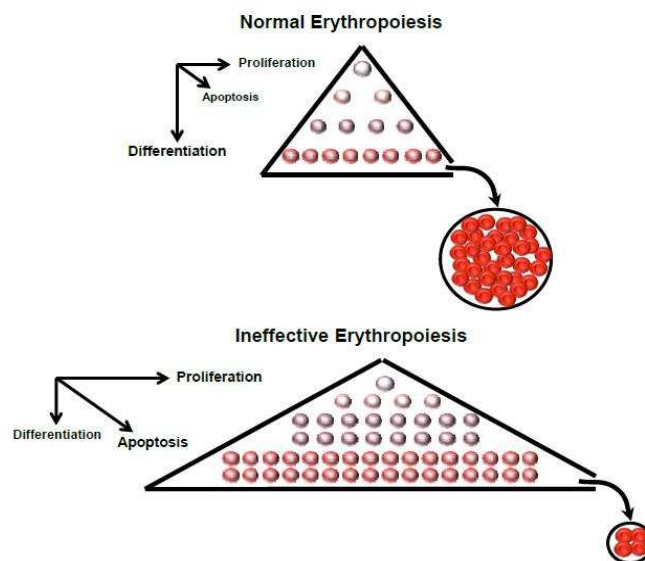


Figura 26 - Rappresentazione schematica dell'eritropoiesi normale ed inefficace.

L'apparato eritropoietico dei TI è affetto da alterazioni della produzione di catene beta globiniche; questo porta ad un'incompleta maturazione degli eritrociti: la maggior parte di essi subisce un'emolisi intramidollare, mentre i globuli rossi che riescono a raggiungere il circolo ematico, vengono eliminati a causa del deposito di emicromi a livello delle membrane che ne alterano la struttura (Figura 27). L'emolisi intramidollare e periferica generano uno stato di ipossia che garantisce la produzione di eritropoietina, la quale andrà a stimolare l'eritropoiesi che però è incompleta. Si instaura così un circolo vizioso caratterizzato anche da un continuo sovraccarico di ferro che nella TI, a differenza delle

TM, non è dovuto alle trasfusioni, bensì al continuo assorbimento intestinale e alla continua distruzione degli eritrociti da parte dell'apparato reticolo endoteliale (RE) che rilascia nel circolo sanguigno il ferro che avrebbe dovuto costituire il gruppo eme. Il sovraccarico di ferro nelle talassemie è dovuto al fatto che a livello molecolare vi è una scorretta regolazione dell'epcidina.

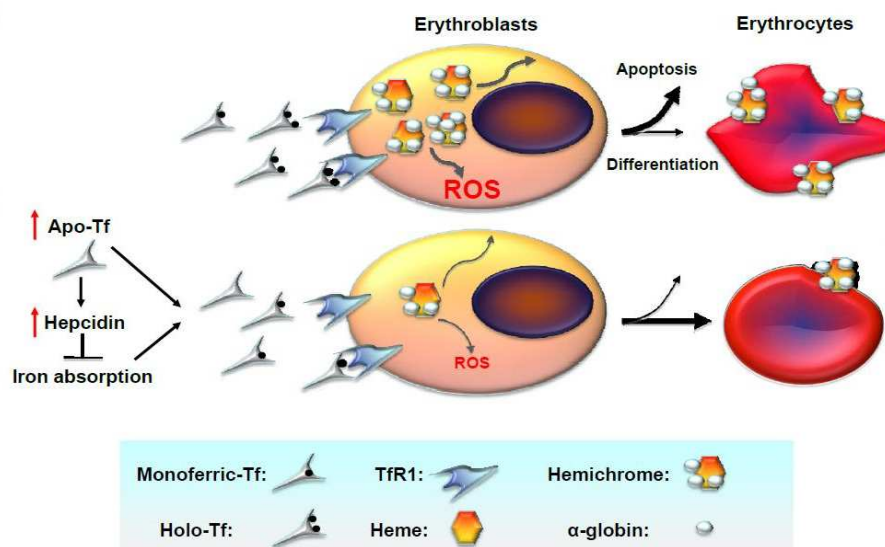


Figura 27 - L'aumento di ferro intracellulare nei progenitori eritroidi causa danno e apoptosi cellulare.

CAPITOLO 3: IL DIFFERENZIAMENTO ERITROIDE

❖ L'EMOPOIESI

Le cellule del sangue possono essere classificate in due principali categorie: cellule linfoidi (cellule B, T e natural killer) e cellule mieloidi (granulociti, monociti, eritrociti e megacariociti); tutte hanno una vita media limitata (alcune ore per i granulociti, alcune settimane per gli eritrociti, alcuni anni per le cellule T memoria), per cui devono essere continuamente rinnovate o sostituite (110,111).

Le cellule mature originano tutte da una cellula emopoietica staminale multipotente (HSC); da tale precursore comune derivano le cellule staminali pluripotenti linfoidi e mieloidi; da queste ultime (CFU-GEMM) traggono origine almeno tre tipi di cellule progenitrici commissionate, orientate cioè verso il differenziamento in senso eritroide, megacariocitico, eosinofilo o granulocitico – macrofagico. Dalle diverse cellule staminali commissionate originano poi stadi intermedi ed infine i precursori, riconoscibili morfologicamente, delle linee cellulari differenziate: proeritroblasti, mieloblasti, megacarioblasti, monoblasti ed eosinofiloblasti. Da questi deriva a sua volta la progenie matura.

L'emopoiesi è quindi un processo altamente regolato composto da più tappe:

- commitment a una specifica filiera differenziativa,
- proliferazione e differenziazione dei progenitori,
- maturazione dei precursori

Nella vita adulta il midollo osseo rappresenta l'unica sede di produzione delle HSC, le quali costituiscono una percentuale molto bassa, stimabile tra lo 0.05% e lo 0.5%, di tutte le cellule midollari.

Le cellule staminali multipotenti HSC possono automantenersi o differenziarsi in progenitori commissionati, i quali perdono la capacità di autorinnovamento e originano cellule mature aventi una particolare funzione.

La scelta tra i due destini possibili della cellula staminale, automantenimento o commitment, è altamente regolata da segnali sia intrinseci (fattori trascrizionali, molecole di trasduzione del segnale, fattori regolanti il ciclo cellulare) sia provenienti dal microambiente esterno (Figura 28).

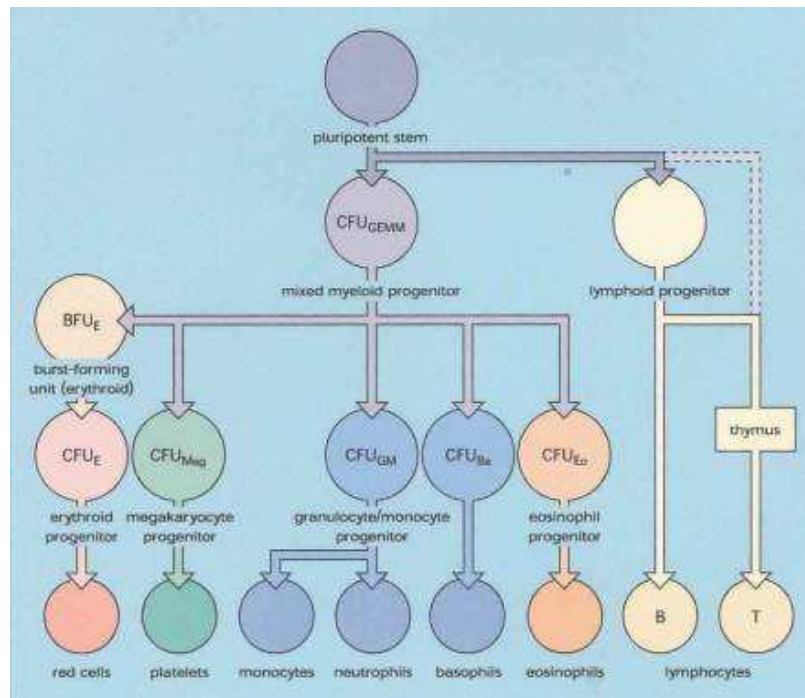


Figura 28 – L'emopoiesi.

Il microambiente midollare svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'emopoiesi; esso include le cellule stromali, le molecole della matrice extracellulare e varie citochine solubili che agiscono come fattori di crescita e differenziazione legandosi a specifici recettori espressi sulla superficie dei progenitori ematopoietici.

I vari fattori di crescita possono agire a diverse fasi del processo emopoietico; sono infatti noti e ben caratterizzati fattori indispensabili per il reclutamento nel ciclo cellulare dei progenitori staminali, i quali sono normalmente in fase G₀, fattori che agiscono sui

progenitori intermedi e fattori linea-specifici che inducono la proliferazione dei progenitori già orientati in senso maturativo.

Tra i fattori che agiscono a livello dei progenitori primitivi riveste particolare importanza il fattore SCF (*stem cell factor* o *c-KIT ligand*) prodotto dalle cellule stromali e indispensabile per l'automantenimento della cellula staminale pluripotente (112). Il commitment a una specifica filiera differenziativa è invece determinato dalla natura e dalla concentrazione dei fattori agenti sulle cellule progenitrici.

Mentre i precursori e le cellule mature possono essere riconosciuti morfologicamente, le cellule staminali e i progenitori commissionati possono essere identificati solo attraverso saggi funzionali in vitro o con un'analisi immunofenotipica. I saggi funzionali si basano sull'abilità dei progenitori emopoietici di generare colonie di cellule mature in appropriate condizioni di coltura e con gli opportuni fattori di crescita.

Da un punto di vista immunofenotipico le cellule staminali sono caratterizzate dalla presenza degli antigeni di superficie CD34 e AC133 (113). La frazione cellulare CD34⁺ è eterogenea comprendendo sia cellule primitive (cellule staminali HSC) sia cellule commissionate (progenitori); l'espressione concomitante del CD34 e di marcatori immunologici associati ad una specifica filiera differenziativa, quali CD38 e HLA-DR, permette però di suddividere tale frazione in sottopopolazioni di progenitori più o meno primitivi. Oltre che nel midollo osseo le cellule CD34⁺ possono essere riscontrate anche nel sangue di cordone ombelicale e nel sangue periferico. In condizioni fisiologiche, l'1-3% della frazione mononucleare del midollo osseo esprime l'antigene CD34, contro lo 0.1-0.2% del sangue periferico e lo 0.8-1.2% del sangue di cordone ombelicale.

❖ L'ERITROPOIESI

Il processo di formazione degli eritrociti maturi circolanti a partire dalle cellule staminali emopoietiche (HSC) prende il nome di eritropoiesi; esso si compone di più tappe: commitment in senso eritroide delle HSC, proliferazione e differenziazione dei progenitori (BFU-E e CFU-E), maturazione dei precursori eritroidi o eritroblasti.

L'eritropoiesi è regolata da numerose citochine e fattori di crescita i quali, legandosi a recettori specifici localizzati sulla membrana dei progenitori o precursori eritroidi, inducono l'attivazione di fattori trascrizionali; questi, legandosi a sequenze specifiche di DNA, permettono l'espressione dei geni necessari per la proliferazione, differenziazione e maturazione. Progredendo attraverso i vari stadi dell'eritropoiesi le cellule perdono la capacità di differenziarsi in altri tipi cellulari (linfociti, monociti, ecc.) e diventano sempre più orientate in senso eritroide. Prima della formazione di eritroblasti policromatofili il numero di cellule a ciascuno stadio è superiore a quello dello stadio precedente a causa dell'intensa attività di divisione cellulare. Oltre questo passaggio le cellule eritroidi non si dividono più ma subiscono un processo di maturazione che porta alla formazione di eritrociti biconcavi, privi di organelli e con un contenuto di emoglobina superiore al 30% del volume totale (114) (Figura 29).

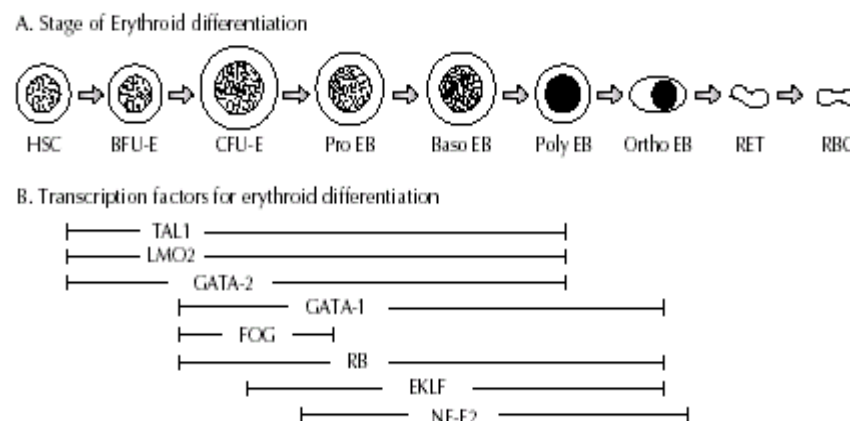


Figura 29 – Il differenziamento eritroide.

I precursori eritroidi sono riconoscibili morfologicamente mentre i progenitori sono cellule mononucleate identificabili solo sulla base di test funzionali.

Le BFU-E (*erythroid burst-forming unit*) e le CFU-E (*erythroid colony forming unit*) costituiscono i primi elementi commissionati capaci di formare colonie se stimolati con opportuni fattori di crescita e, in particolare, con l'eritropoietina. Le BFU-E dopo 14-16 giorni di coltura in terreno semisolido danno origine a macrocolonie (burst) di eritroblasti policromatofili ortocromatici contenenti emoglobina. Le BFU-E sono cellule per lo più quiescenti (solo il 10-20% è in ciclo) e, oltre che nel midollo osseo, sono presenti anche nel sangue periferico (10-20 BFU-E ogni 10^5 cellule totali). Esse esprimono sulla membrana cellulare l'antigene CD34 e gli antigeni HLA di classe 2; solo le *late* BFU-E presentano anche una piccola quantità di recettori per l'eritropoietina.

Le CFU-E vengono considerate progenitori più maturi rispetto alle BFU-E, in quanto, se poste in coltura, impiegano solo 5-6 giorni per formare colonie eritroidi. Le CFU-E presentano un'intensa attività proliferativa: la maggior parte si trova infatti nella fase S del ciclo cellulare; tali cellule hanno perso la capacità di automantenersi e non sono presenti in periferia. Le CFU-E non esprimono più sulla loro superficie né il CD34 né gli antigeni HLA 2, mentre acquisiscono proteine di superficie specifiche della serie eritroide quali la glicoforina A e gli antigeni del sistema Rh, oltre ai recettori per l'eritropoietina: questi arrivano fino ad un massimo di circa 1.1×10^3 per cellula (114). Il comparto dei precursori eritroidi è costituito da: proeritroblasto, eritroblasto basofilo, eritroblasto policromatofilo, eritroblasto ortocromatico, reticolocita e infine eritrocita (Figura 30).

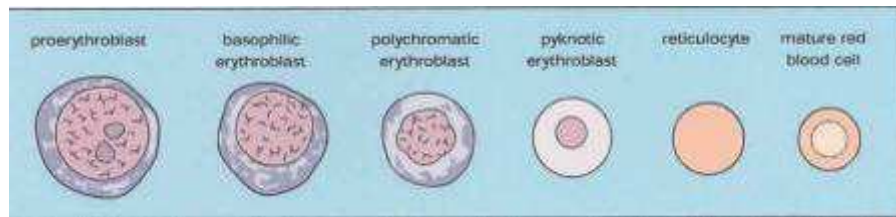


Figura 30 – I precursori eritroidi.

Nel processo di maturazione eritrocitaria si ha una progressiva diminuzione delle dimensioni cellulari (20-25 μ m per il proeritroblasto, 7 μ m per l'eritrocita) e della capacità di sintesi proteica. Allo stadio di reticolocita si ha la completa espulsione del nucleo e la successiva degradazione degli organelli citoplasmatici; questa sembra essere mediata almeno in parte dalla 15-lipoossigenasi, la quale promuoverebbe l'ossidazione enzimatica dei fosfolipidi e la permeabilizzazione della membrana degli organelli. Durante gli stadi finali dell'eritropoiesi si ha poi un graduale aumento nell'espressione del gene antiapoptotico Bcl-X_L il quale permette la sopravvivenza cellulare. Con l'eliminazione dei mitocondri e dei lisosomi l'eritrocita può essere considerato maturo. La funzione principale del globulo rosso è quella di trasportare, per mezzo dell'emoglobina, l'ossigeno dai polmoni ai tessuti periferici e l'anidride carbonica dai tessuti ai polmoni; l'eritrocita svolge tali funzioni grazie al suo apparato metabolico ed enzimatico e alla struttura della sua membrana. Con la scomparsa anche dei ribosomi comincia l'involuzione del globulo rosso fino alla completa eliminazione negli organi emocateretici, specialmente nella milza (1144,115).

❖ **FATTORI DI CRESCITA REGOLANTI L'ERITROPOIESI**

La proliferazione, maturazione e differenziazione dei progenitori eritroidi è regolata dall'interazione di numerosi fattori di crescita ematopoietici (SCF, EPO, TPO, IL-3, IL-6,

GM-CSF, G-CSF) con gli specifici recettori di membrana e dalla conseguente attivazione delle appropriate vie di trasduzione del segnale (Figura 31).

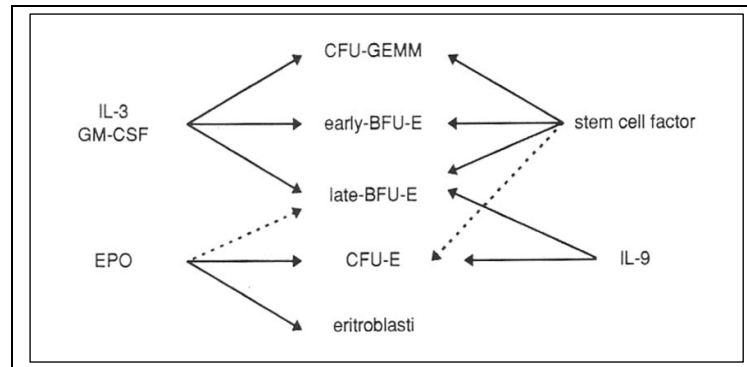


Figura 31 – Fattori di crescita regolanti l'eritropoiesi.

I fattori di crescita possono essere classificati in più modi:

- in base al tipo di cellula su cui agiscono (progenitori primitivi oppure già commissionati a una specifica filiera differenziativa)
- in base al tipo di recettore a cui si legano (dotato di attività tirosin chinasi intrinseca oppure no)
- in base alla modalità di presentazione alle cellule target (come fattori solubili, come molecole di superficie richiedenti un contatto diretto cellula-cellula oppure come parte del microambiente midollare) (116).

Le varie citochine ematopoietiche presentano una struttura terziaria di base comune; la specificità del legame al recettore è garantita dalla presenza di un particolare set di residui aminoacidici di superficie diverso da citochina a citochina.

Anche i recettori ematopoietici presentano una struttura di base comune; il loro segmento citoplasmatico contiene un dominio con attività tirosin chinasi, la quale risulta però inattiva in assenza di fosforilazione. Il legame del recettore con il fattore di crescita induce

l'attivazione di tale attività chinasi attraverso un meccanismo basato sulla dimerizzazione.

Le citochine ligando infatti sono dimeriche e permettono così l'interazione di due subunità recettoriali; la giustapposizione dei due domini catalitici ne favorisce l'attivazione e la fosforilazione reciproca (trans-fosforilazione). Le tirosine così fosforilate costituiscono il sito di legame per le molecole trasduttrici del segnale (116). I fattori eritropoietici sono in grado di attivare diverse vie di trasduzione del segnale, tra le quali rivestono particolare importanza quella delle MAP chinasi p42/44 (*Mitogen Activated Protein Kinase*), delle JAK-STAT chinasi e dell'asse PI-3K-AKT (*fosfoinositolo-3 chinasi*). In particolare la proliferazione cellulare è legata all'attivazione simultanea dell'asse MAPK p42/44 e dell'asse JAK-STAT, i quali inducono l'espressione dei geni mitogeni c-myb, c-myc e c-sis. La sopravvivenza cellulare invece richiede l'attivazione anche dell'asse PI-3K-AKT il quale permette l'espressione dei geni per il differenziamento eritroide e, probabilmente, del gene antiapoptotico Bcl-X_L (114,117).

❖ L'ERITROPOIETINA

L'eritropoietina costituisce il regolatore principale dell'eritropoiesi; essa agisce sia a livello dei progenitori primitivi (BFU-E) in associazione ad altri fattori di crescita (c-Kit ligand, TPO, IL-3), sia a livello dei progenitori tardivi (CFU-E) permettendone la differenziazione finale. L'eritropoietina è una sialoglicoproteina composta da 165 aminoacidi e con un peso molecolare di circa 34 kD. Nel feto essa viene prodotta principalmente nel fegato, mentre nell'adulto l'organo deputato alla sintesi di oltre l'80% dell'ormone circolante è il rene e, in particolare, le cellule della corticale interna e quelle adiacenti ai tubuli convoluti prossimali; solo una quota minima (circa il 10%) viene sintetizzata nel fegato (118).

Il principale fattore fisiologico che regola la produzione di eritropoietina è l'apporto di ossigeno ai tessuti: una condizione di ipossia induce un aumento dei livelli sierici di EPO. L'aumentata produzione di EPO è dovuta principalmente ad una maggiore trascrizione genica: è stata infatti dimostrata la presenza di un elemento ipossia-inducibile a livello del promotore e della regione fiancheggiante in 3' del gene per l'EPO, localizzato sul cromosoma 7. È inoltre possibile una regolazione anche a livello dell'mRNA: infatti è stata identificata una proteina, i cui livelli aumentano in condizioni di ipossia, la quale si lega alla regione non tradotta in 3' (UTR) dell'RNA messaggero per l'EPO prolungandone la stabilità.

L'eritropoietina permette all'organismo di far fronte alla condizione di ipossia in tre modi:

- stimola il rilascio dei normoblasti dal midollo osseo
- aumenta la quantità di emoglobina sintetizzata da ogni eritrocita
- stimola l'espansione delle BFU-E e la differenziazione delle CFU-E in globuli rossi maturi.

L'aumentato numero di eritrociti circolanti così ottenuti è dovuto non tanto ad una maggiore proliferazione cellulare, quanto piuttosto alla sopravvivenza di una percentuale più alta di progenitori eritroidi. È stato infatti dimostrato, in sistemi di coltura in vitro, che l'EPO previene la morte cellulare programmata (apoptosi) a livello soprattutto delle CFU-E e degli eritroblasti, espandendo in tal modo l'eritropoiesi (116). L'eritropoietina agisce dunque più come un fattore di sopravvivenza che non come mitogeno.

Secondo il modello proposto da DeMaria infatti la presenza di EPO permette l'attivazione del fattore trascrizionale GATA1 e la conseguente espressione del gene anti-apoptotico Bcl-X_L. In assenza di EPO si ha invece il legame di Fas-Ligand al proprio recettore: ciò porta all'attivazione delle caspasi, al clivaggio di GATA1 e quindi alla morte della cellula per apoptosi (119). L'EPO svolge il suo ruolo legandosi ad uno specifico recettore presente

sulla superficie cellulare dei precursori eritroidi; il gene per tale recettore è localizzato sul cromosoma 19p e codifica per una proteina di circa 55kD. Il numero dei recettori per cellula varia in rapporto allo stadio differenziativo e maturativo, essendo massimo per le CFU-E/eritroblasti, oltre che in relazione ai livelli sierici di eritropoietina: una diminuzione di questi induce un aumento del numero di recettori.

L'espressione di EPO-R dipende principalmente dal fattore trascrizionale GATA1; importanti sono anche i siti di legame per Sp1 e la sequenza consenso CACCC localizzata nel promotore, oltre ai siti ipersensibili alla DNAsi della LCR (*locus control region*) a monte del sito di inizio di trascrizione (116).

❖ FATTORI TRASCRIZIONALI REGOLANTI L'ERITROPOIESI

Il potenziale differenziativo e proliferativo dei progenitori verso una determinata linea cellulare (commitment) è regolato da fattori che consentono la trascrizione di geni specifici per quella filiera differenziativa; ciò avviene attraverso il legame a sequenze consenso presenti nei promotori, negli enhancers e nei siti DNAsi 1-ipersensibili della LCR. I fattori trascrizionali possono essere suddivisi in due categorie: i primi agiscono a livello dei progenitori pluripotenti determinandone il commitment in senso eritroide (TAL1, LMO2, GATA2), gli altri inducono la differenziazione e maturazione dei precursori commissionati (NF-E2, EKLF, GATA1) (120) (Figura 32).

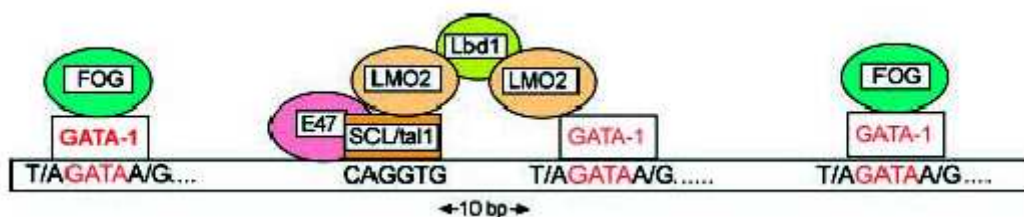


Figura 32 – Fattori trascrizionali regolanti l'eritropoiesi.

TAL1. Appartiene alla famiglia dei fattori trascrizionali helix-loop-helix (bHLH) e si ritiene sia coinvolto nel commitment eritroide. Nelle cellule di eritroleucemia murina TAL1 agisce da repressore trascrizionale essendo associato al corepressore mSin3A e alla istone deacetilasi HDAC1; in tal modo inibisce la differenziazione eritroide.

GATA. La famiglia dei GATA comprende sette proteine zinc-finger tra cui GATA1 e GATA2 sembrano avere un ruolo fondamentale nell'eritropoiesi; esperimenti di knock-out per questi due fattori trascrizionali risultano infatti in un arresto del differenziamento e della maturazione eritroide (121,122).

GATA1 è importante soprattutto per la differenziazione e maturazione eritroide: la sua mancanza determina infatti un arresto allo stadio di proeritroblasto. Il motivo centrale di legame, contenente la sequenza consenso (A/T) GATA (A/G), è presente nei promotori e negli enhancers di molti geni eritroide-specifici: gene delle globine, del recettore per l'eritropoietina, della deaminasi porfobilinogena (un enzima della via biosintetica dell'eme) e del GATA stesso (122). È infatti verosimile che GATA1 regoli negativamente GATA2 in quanto quest'ultimo diminuisce all'aumentare di GATA1 durante la differenziazione.

GATA2 è coinvolto nella proliferazione e sopravvivenza delle cellule ematopoietiche precoci, nelle quali è altamente espresso. La quantità di tale fattore diminuisce poi durante la maturazione a cellule circolanti. Sembra che il meccanismo d'azione di GATA2 sia quello di aumentare la responsività ai vari fattori di crescita e in particolare al c-Kit ligand (SCF) (123).

EKLF (Erythroid Kruppel-Like Factor). È un fattore trascrizionale eritroide-specifico che permette l'espressione del gene β -globinico legandosi alla sequenza consenso CACCC presente nel promotore. Tale fattore potrebbe anche facilitare l'interazione del promotore β -globinico con l'LCR, contribuendo in tal modo alla diminuzione dell'espressione del

gene γ durante lo switch globinico. E' stato inoltre recentemente dimostrato che il knockdown di EKLF1 riduce i livelli di BCL11A e aumenta il rapporto globinico γ/β . E' stato quindi proposto che EKLF1 controlli lo switch globinico attivando direttamente il gene β e reprimendo indirettamente l'espressione del gene γ -globinico (124).

SP1. È un fattore coinvolto nella regolazione della maturazione eritroide; si ipotizza che, interagendo con il GATA1 e legandosi alla regione LCR o al promotore dei geni γ -globinici, ne attivi la trascrizione o interferisca nello switching globinico (125).

SOX6. E' un membro della famiglia di fattori trascrizionali Sox (Sry-type HMG box), caratterizzati dalla presenza di un dominio HMG che riconosce l'elica minore del DNA. La capacità delle proteine Sox di legarsi ad altri fattori trascrizionali e di alterare la sequenza del DNA, suggerisce che esse agiscano come "proteine architetturali" probabilmente promuovendo l'assemblaggio di complessi multiproteici. Sox6 sembra agire sia come attivatore che come repressore trascrizionale a seconda dell'interazione con specifiche sequenze target (126). Studi recenti indicano come l'ablazione completa di Sox6 causi un'alterazione dell'eritropoiesi con il conseguente rilascio nella circolazione fetale di un numero aumentato di cellule nucleate e porti ad una aumentata espressione del gene globinico embrionale ϵ . In particolare è stato proposto che Sox6 diminuisca l'espressione del gene globinico $\epsilon\gamma$ durante l'eritropoiesi murina e che cooperi con BCL11A nella downregolazione dell'espressione del gene γ globinico nelle cellule eritroidi adulte (127). Infine è stato recentemente dimostrato come l'espressione di Sox6 diminuisca durante gli stadi finali dell'eritropoiesi e come Sox6 stesso sia in grado di regolare la propria downregolazione mediante un doppio legame all'interno del suo stesso promotore (126).

BCL11A. E' un fattore trascrizionale che agisce come repressore dell'espressione del gene γ -globinico; studi recenti infatti hanno dimostrato come il knockdown di BCL11A risulti in

un aumento dei livelli di γ -globina (128). L'espressione del BCL11A varia durante il differenziamento eritroide e durante l'ontogenesi. Esso è espresso ad alti livelli e come forma full-length attiva negli stadi adulti quando il gene γ -globinico è silente, mentre nell'embrione e nel feto la sua espressione è più bassa e predominano le isoforme più corte meno attive (129).

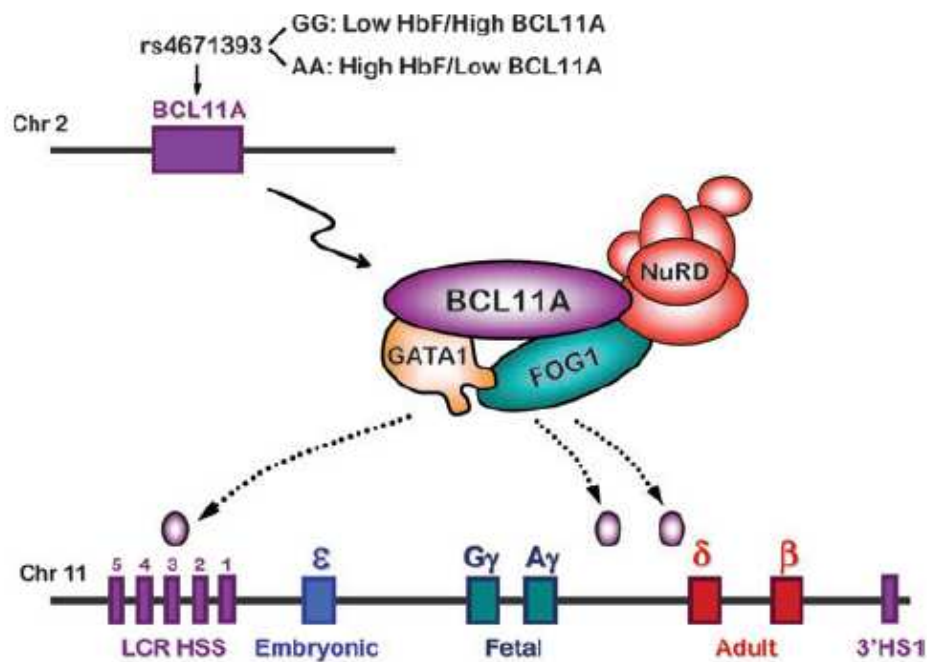


Figura 33 – Meccanismo d'azione di BCL11A.

BCL11A sembra regolare in modo specifico l'espressione del gene γ -globinico; esso si lega infatti a livello della cromatina del locus β -globinico interagendo con il terzo sito ipersensibile della LCR e con regioni distinte localizzate tra il gene $A\gamma$ e δ -globinico, mentre non sembra legare il promotore γ -globinico (128).

Mediante studi di proteomica, si è dimostrato come BCL11A sia in grado di interagire con diverse proteine: con NuRD, un complesso di repressori trascrizionali contenente anche

due istone-deacetilasi (HDAC1 e HDAC2), con il fattore trascrizionale GATA1 e FOG mediante un legame zinc-fingers (130) e con il componente della matrice nucleare Matrin-3 (Figura 33). Sembra quindi che attraverso tali interazioni, BCL11A abbia un ruolo chiave nella regolazione dello switch globinico da fetale ad adulto, così come nel silenziamento del gene γ -globinico nelle cellule eritroidi mature. Per questo BCL11A costituisce un importante target terapeutico per l'attivazione di HbF in pazienti con β -talassemia.

❖ SWITCH DI SINTESI DELLE GLOBINE

La proliferazione e maturazione eritroide è caratterizzata dal progressivo aumento di produzione di emoglobina (Hb). La struttura dell'emoglobina umana cambia durante lo sviluppo per far fronte alle diverse necessità di ossigeno da parte dell'organismo (131).

La sintesi di emoglobina risulta caratterizzata da due switch principali: il primo, da Hb embrionale a Hb fetale, coincide con la transizione da emopoiesi primitiva (che avviene nel sacco vitellino) a emopoiesi definitiva (nel fegato fetale dal quarto mese di gravidanza); il secondo, da Hb fetale a Hb adulta, avviene nel periodo perinatale.

L'emoglobina embrionale risulta formata da due catene ζ e da due catene ϵ ($\zeta_2\epsilon_2$); l'emoglobina fetale è costituita da due catene α e da due catene γ ($\alpha_2\gamma_2$) e infine l'emoglobina adulta HbA da due catene α e da due catene β . Nell'adulto oltre ad HbA ($\alpha_2\beta_2$), che costituisce la forma principale di emoglobina (98%), si ha anche una quota minore di HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$, 2%) e di HbF ($\alpha_2\gamma_2$, in tracce). I geni per le catene α e β sono localizzati in cluster e disposti da 5' a 3' nell'ordine in cui verranno espressi durante lo sviluppo. Il cluster β globinico è localizzato sul cromosoma 16 e risulta formato dal gene embrionale ϵ e da due copie del gene γ oltre che da due pseudogeni non funzionanti. Il cluster β globinico è invece localizzato sul cromosoma 11 ed è costituito dal gene

embrionale ϵ , da due copie del gene γ che differiscono tra loro per l'aminoacido in posizione 136 (G o A) e dai geni δ e β espressi nell'adulto.

A monte dei due cluster globinici è presente una regione regolatoria denominata LCR (*locus control region*) per il cluster β e HS-40 per il cluster α . Tale regione permette l'attivazione trascrizionale in sequenza dei geni globinici di ciascun cluster (Figura 34).

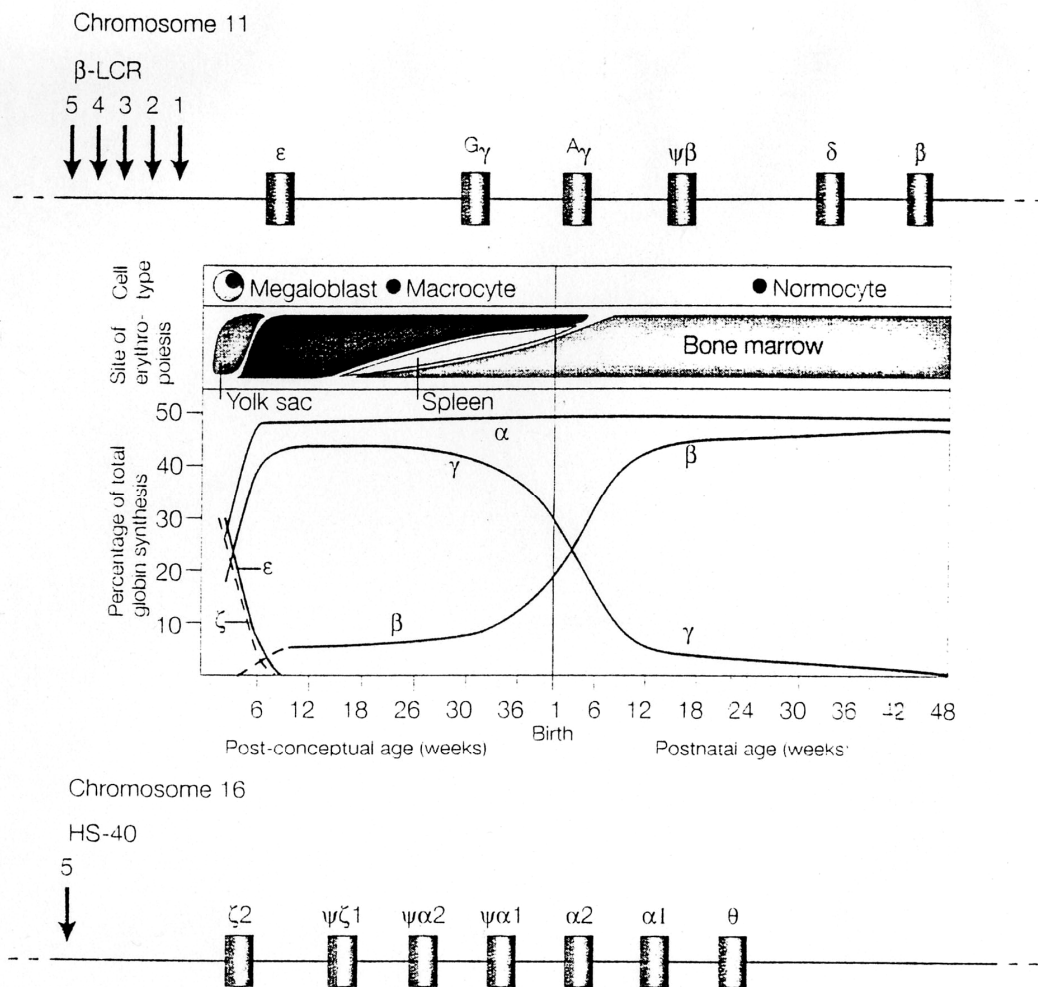


Figura 34 - Switch globinico.

La regolazione dello switch globinico avviene principalmente a livello trascrizionale ma i suoi meccanismi non sono ancora completamente conosciuti. Studi molecolari hanno

finora evidenziato come la trascrizione dei geni globinici sia regolata da interazioni proteina-DNA e proteina-proteina. A livello del promotore di ciascun gene globinico sono infatti presenti sequenze consenso, come TATA box, CCAAT box e CACCC box, le quali interagiscono sia con la regione LCR sia con fattori trans-attivanti per promuovere la trascrizione genica. Recentemente sono stati riportati numerosi studi che hanno permesso di aggiungere importanti tasselli nella comprensione dei meccanismi regolanti lo switch globinico. Studi di genome-wide association e di linkage hanno dimostrato come la variabilità nei livelli di HbF, sia nei pazienti β -talassemici sia nei soggetti sani, sia almeno in parte geneticamente determinata e hanno permesso di individuare tre polimorfismi principali (QTL: quantitative trait loci) che spiegano il 20-50% di tale variabilità: *XmnI-HBG2*, la regione intergenica *HBSIL-MYB* sul cromosoma 6q23 e *BCL11A* sul cromosoma 2p16 (132). In particolare ad esempio il polimorfismo GG in posizione rs4671393 del gene *BCL11A* è risultato essere associato a bassi livelli di HbF ed alti livelli di *BCL11A*, mentre la variante AA è associata ad alti livelli di HbF e a bassi livelli di *BCL11A* (128). Un ruolo chiave nella regolazione dello switch globinico è stato attribuito:

- a *BCL11A*, un potente silenziatore di HbF
- a *EKLF1*, fattore trascrizionale che attiva *BCL11A*
- alle modificazioni epigenetiche del cluster β .

Come precedentemente riportato, *BCL11A* si associa a diversi fattori trascrizionali formando un complesso multiproteico, comprendente NuRD, GATA1 e SOX6, importante per la repressione del gene γ -globinico (129).

EKLF1 sembra avere un duplice ruolo: esso diminuisce l'espressione del gene γ -globinico sia stimolando la trascrizione del gene β -globinico sia attivando il repressore *BCL11A* con ulteriore repressione dell'espressione della γ -globina (133). *cMyb* potrebbe reprimere

l'espressione della γ -globina attraverso l'attivazione di BCL11A mediata da EKLF1 (133). Infine complessi multiproteici comprendenti l'arginina metiltransferasi PRMT5, l'enzima demetilante DNMT3A, la serina/treonina chinasi CK2alpha e componenti di NuRD, occupano il promotore γ -globinico metilandolo e rendendolo trascrizionalmente inattivo. In Figura 35 è riportato un possibile meccanismo di interazione tra vari fattori trascrizionali cooperanti per diminuire l'espressione del gene γ -globinico. Tutti questi fattori rappresentano nuovi possibili target terapeutici per riattivare il gene γ -globinico e aumentare i livelli di HbF in pazienti con β -talassemia (133).

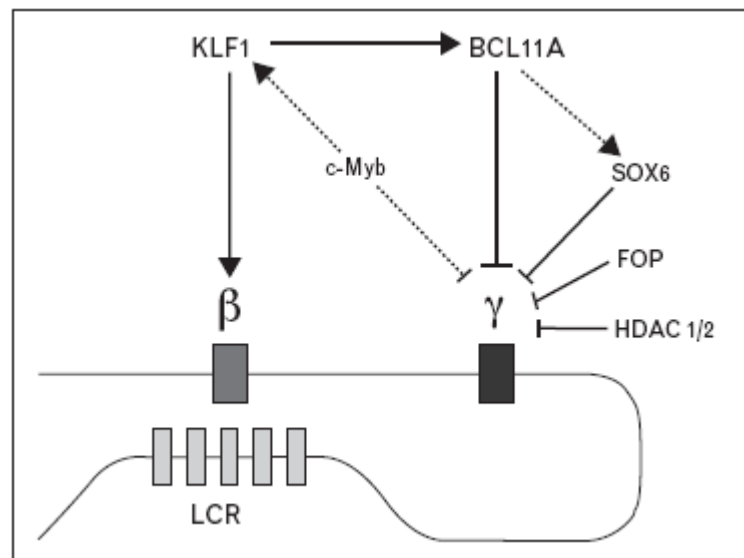


Figura 35 - Possibile modello di regolazione dell'espressione dei geni globinici.

SCOPO

L'obiettivo del progetto di dottorato è stato quello di chiarire e approfondire la comprensione dei meccanismi di regolazione del metabolismo del ferro in condizioni sia fisiologiche che patologiche, facendo riferimento per queste ultime alle sindromi beta talassemiche, in particolare le beta talassemie intermedie (TI) trasfusione indipendente e le talassemie major (TM). Le manifestazioni cliniche della TI sono il risultato di tre fattori chiave: eritropoiesi inefficace, anemia cronica e sovraccarico di ferro. A differenza dei pazienti con TM, nei quali il sovraccarico di ferro è dovuto soprattutto alla terapia trasfusionale, i pazienti con TI accumulano ferro principalmente a causa di un aumentato assorbimento intestinale e per l'eritropoiesi inefficace. Questo comporta un aumento di ferro nel plasma rilasciato dai tessuti e captato dalla transferrina, la quale viene saturata con la conseguente comparsa di ferro libero in eccesso. Ciò causa tossicità e danni tissutali. I livelli fisiologici del ferro sono determinati prevalentemente dall'assorbimento intestinale, dal suo utilizzo per l'eritropoiesi, dal rilascio di questo da parte dei macrofagi e dal riciclo dei globuli rossi senescenti. Le proteine responsabili della regolazione dei livelli di ferro nell'organismo sono l'epcidina (HAMP) e la ferroportina (FPN). L'interazione epcidina – ferroportina causa la fosforilazione e l'ubiquitinazione da parte dei lisosomi di quest'ultima che viene così eliminata dalla superficie della membrana plasmatica impedendo la fuoriuscita di ferro cellulare, ottenendo così come risultato finale un abbassamento della concentrazione plasmatica di ferro. Nonostante il ruolo chiave attribuito all'epcidina nella regolazione dell'omeostasi del ferro, i meccanismi che ne regolano l'espressione sono sconosciuti, in particolare non si sa come l'aumentata attività eritropoietica presente nella TI riduca l'espressione di epcidina. Un gene candidato alla spiegazione di ciò è il GDF15 (growth differentiation factor 15), che viene secreto dagli

eritroblasti durante l'eritropoiesi. Di questo gene si sa ancora poco, le uniche informazioni derivano da studi su soggetti TM e da studi in vitro su linee cellulari. Dal primo studio condotto sui soggetti affetti da TM, si è osservato che il GDF15 è presente nel siero ad alti livelli e il suo ruolo potrebbe essere quello di inibire l'espressione di epcidina a livello del fegato. La diminuzione di epcidina causa un aumento dell'assorbimento di ferro da parte dell'intestino e un aumento del livello complessivo del ferro totale nell'organismo. Il perché il GDF15 nei soggetti beta talassemici sia espresso maggiormente rispetto ai soggetti sani e le modalità secondo le quali esso regoli negativamente l'espressione di epcidina sono tutt'ora sconosciute. Alla luce di tali limiti e questioni, il progetto di dottorato ha puntato ad estendere i dati preliminari presenti in letteratura anche alle TI e alle linee cellulari primarie. Inoltre è stata postulata e verificata una possibile modulazione del ferro sul GDF15 sia in cellule provenienti da soggetti sani che talassemici e dove ciò non è stato sufficiente a spiegare quanto veniva osservato, si è tornati a valutare in modo più ampio i fattori chiave alla base delle sindromi talassemiche per cercare di comprendere anche le diverse connessioni cliniche e molecolari che differenziano una talassemia major da una intermedia. Lo studio in oggetto ha avuto lo scopo anche di ampliare le informazioni presenti in letteratura in merito alla ferroportina; è nota infatti la sua espressione in cellule eritroidi mentre non è stata ancora chiarita la sua funzione e soprattutto non si conosce il suo profilo di espressione nelle sindromi talassemiche. In particolare, in seguito alla scoperta delle due isoforme FPN1A e FPN1B rispettivamente con e senza IRE (iron responsive element), risultava importante capire la modulazione della loro espressione in condizioni di alterazioni del metabolismo del ferro, proprio come le talassemie. Infine, meritevoli di attenzione sono stati i macrofagi che giocano un ruolo importante nel controllare la biodisponibilità di ferro per l'eritropoiesi. Queste cellule, infatti, che fagocitano i globuli rossi senescenti, riciclano circa 20-25 mg di ferro eme,

quantità necessaria per la produzione giornaliera di nuovi eritrociti. E' noto, così come nelle cellule eritroidi, che anche nei macrofagi la ferroportina è molto espressa ma non è chiaro se la loro gestione del ferro dipenda maggiormente dal ferro intracellulare o da un signaling a livello sistemico. In virtù dei numerosi quesiti tutt'oggi irrisolti, il progetto di dottorato si inserisce all'interno di una forte necessità di comprendere i meccanismi di regolazione dell'omeostasi del ferro, soprattutto nelle sindromi talassemiche particolarmente coinvolte in questa complessa rete di alterazione.

Di seguito vengono riassunti in modo schematico i principali obiettivi dello studio:

- ❖ studiare il profilo di espressione di epcidina, GDF15 e ferroportina, in normale, TI e TM in relazione alle concentrazioni di GDF15 nel surnatante durante il differenziamento eritroide;
- ❖ studiare i geni implicati nella regolazione dell'epcidina, in particolare il GDF15 e la ferroportina, attraverso la creazione sperimentale di situazioni che simulano la ferro deplezione (deferossamina) o la ferro saturazione (ferro ammonio citrato) sia a partire da soggetti controllo che da pazienti talassemici intermedi (TI) e major (TM);
- ❖ studiare il pathway dell'epcidina, con particolare attenzione al GDF15 e alla ferroportina, nei macrofagi isolati dal sangue periferico di soggetti con TI, TM e di controlli sani e successivamente trattati con chelante del ferro e ferro ammonio citrato.

MATERIALI E METODI

❖ COLTURE DI CELLULE CD34⁺ DERIVATE DA SANGUE PERIFERICO

Le cellule mononucleate derivate da sangue periferico vengono arricchite in cellule CD34⁺ con metodo immunomagnetico, usando biglie magnetiche leganti l'anticorpo anti-CD34⁺ (*Mini & Midi MACS Separation System, Miltenyi Biotech*).

Separazione di cellule mononucleate

Il sangue periferico di soggetti controllo, fornito dal Centro Trasfusionale dopo i controlli di routine, viene diluito 1:1 con PBS 1X (*phosphate buffered saline, GIBCO BRL*), stratificato su un gradiente di Lymphoprep (*Nycomed – Pharma*) in rapporto 2:1 e centrifugato per 20 minuti a 1980xg a temperatura ambiente. L'anello di cellule mononucleate così formatosi, viene accuratamente raccolto, trasferito in tubi da 50 ml e centrifugato a 300xg per 10 minuti. Per eliminare gli eritrociti maturi eventualmente presenti, il pellet viene risospeso in 50 ml di lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA), incubato per 5-7 minuti a temperatura ambiente e centrifugato a 300xg per 10 minuti. Si procede quindi con due lavaggi a 300xg per 10 minuti ciascuno, risospeso ogni volta il pellet in 50 ml di PBS 1X; in tal modo le piastrine rimangono nel surnatante e vengono così eliminate. A conclusione del secondo lavaggio, il pellet viene diluito in 10 ml di PBS 1X per la conta cellulare.

Separazione immunomagnetica di cellule CD34⁺

Le cellule vengono rispese in Buffer B 1X (PBS 1x, BSA 0.5%, EDTA 2mM, H₂O) (300µl/100x10⁶ cell.) e incubate per 30 minuti a 4 °C con le biglie magnetiche anti-CD34⁺

(100 μ l/ 100x10⁶ cell.) (*MACS Micro Beads*) e con *FcR blocking reagent* che inibisce i legami aspecifici tra cellule e biglie (100 μ l/100x10⁶ cell.). La sospensione cellulare viene quindi fatta passare attraverso una colonna, precedentemente idratata con Buffer B 1X (1 mL per le MiniMACS column, 5 mL per le MidiMACS column), contenente una matrice magnetizzabile e, a sua volta, inserita in un magnete permanente (*MiniMACS Separation unit* per concentrazioni cellulari fino a 2x10⁸ cell. totali; *Midi MACS Separation unit* per concentrazioni cellulari fino a 2x10⁹ cell. totali). In tal modo le cellule CD34⁺ legate alle biglie vengono trattenute nella colonna e separate dalle altre cellule non marcate che oltrepassano la matrice. La colonna viene quindi lavata per tre volte con Buffer B 1X (3x500 μ l per le MiniMACS column, 3x3 ml per le MidiMACS column), così da rimuovere completamente le cellule CD34⁻. Staccando la colonna dal supporto magnetico, le cellule CD34⁺ vengono eluite con PBS 1X (1 ml per MiniMACS column, 5 ml per MidiMACS column) con l'ausilio di uno stantuffo e recuperate in un tubo da 15 ml.

Dopo conta cellulare, le cellule CD34⁺ vengono seminate ad una concentrazione di 10⁵ cell/ml in terreno composto da:

- 70% Mem-Alpha Medium (*GIBCO, BRL*)
- 30% siero bovino fetale (*GIBCO, BRL*)
- 1 U/ml eritropoietina ricombinante umana (*r-Huepo Cilag*)
- 25 ng/ml Stem Cell Factor (*Peprotech*)
- 10 ng/ml Interleuchina-3 (*Peprotech*).

Le colture vengono incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ per 14 giorni (134).

❖ VALUTAZIONE DELLA MORFOLOGIA CELLULARE

Al termine della coltura, o a intervalli di tempo prestabiliti, viene valutata la morfologia, e quindi il grado di differenziamento cellulare, mediante citocentrifugazione su vetrino di circa 0.2×10^6 cellule per 5 minuti a 350 rpm (*Cytospin Shadon Elliot*). Per ogni coltura vengono preparati due vetrini: uno viene colorato con miscela May-Grunwald (soluzione eosina blu di metilene contenente più del 50% di metanolo, *SIGMA*) – Giemsa (soluzione azur-eosina blu di metilene, *SIGMA*), l'altro con benzidina e successivamente con May-Grunwald – Giemsa.

Colorazione con benzidina

Questa colorazione permette di evidenziare con un colore verdognolo la presenza di ferro eminico nelle cellule in esame.

È un ottimo metodo per poter identificare lo stadio di maturazione e differenziamento cellulare (Figura 36).

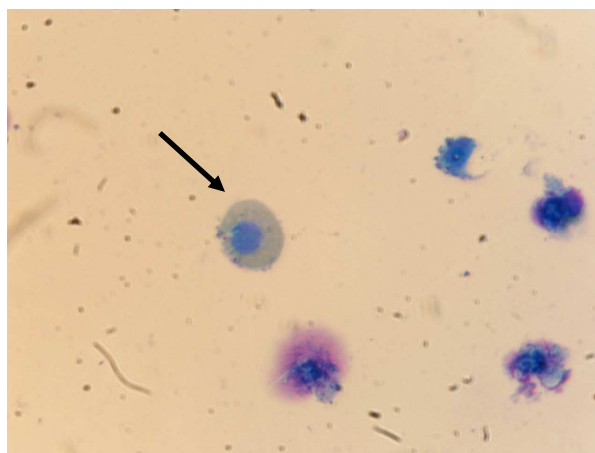


Figura 36 - Eritrocita maturo: con la freccia si può osservare un eritrocita maturo al giorno 14 di coltura, sono evidenziati in blu il nucleo e in verde il citoplasma ricco di ferro legato all'emoglobina.

Colorazione con May-Grunwald – Giemsa

Tale metodo di colorazione consente di valutare la sterilità della coltura e di analizzarne la morfologia, attraverso il legame dei coloranti alle componenti acide (blu di metilene) e basiche (eosina) delle cellule. I vetrini vengono coperti con May-Grunwald filtrato per 7 minuti (l'alcol metilico presente nella soluzione fissa lo spot), sciacquati in acqua e quindi coperti con Giemsa filtrato diluito 1:16 (v/v) per 17 minuti. Infine il vetrino viene lavato in acqua, fatto asciugare e letto al microscopio ad immersione. I nuclei appariranno di un viola più intenso rispetto al citoplasma.

❖ ANALISI AL CITOFUORIMETRO

L'analisi al citofluorimetro consente di determinare la presenza di marcatori di membrana (CD34, CD45, glicoforina) mediante marcatura con anticorpi specifici e di valutare la vitalità cellulare mediante incubazione con propidio ioduro che penetra nelle cellule morte. Le cellule vengono raccolte ai giorni 0, 7 e 14 di coltura, lavate con soluzione salina-fosfato (phosphate-buffered saline PBS; *GIBCO*) e risospese alla concentrazione di 10^5 cellule/100 μ l. Per l'analisi dei marcatori di membrana le cellule vengono incubate per 25 minuti a 4°C con gli anticorpi anti-CD71 (10 μ l, *BectonDickinson*), anti-CD45 (10 μ l, *BectonDickinson*) e anti-glicoforina (5 μ l, *BectonDickinson*). Dopo l'incubazione le cellule vengono centrifugate a 460 rpm per 10 minuti e risospese in PBS. Per la valutazione della vitalità cellulare le cellule vengono incubate per due minuti con propidio ioduro. L'analisi viene effettuata con un citofluorimetro a 3 fluorescenze (FACS *Becton Dickinson*) alla lunghezza d'onda di 480 nm utilizzando il software Cell Quest.

❖ CONTA CELLULARE

La conta delle cellule si effettua comunemente con la camera di Burker. Questa è costituita da un vetrino da microscopio costituito da una serie di righe che formano dei quadrati (emocitometro). Si copre con un vetrino copri oggetto e si ottiene così una camera capillare. L'insieme di linee ortogonali definiscono una serie di aree e quindi di volumi. La camera infatti è suddivisa in 9 quadranti a loro volta suddivisi in quadratini più piccoli al loro interno. Si applica una sospensione di cellule di circa 10 μ l nella camera e, guardando al microscopio, si contano le cellule di almeno tre quadranti. Si preferisce solitamente scegliere tre campi sulla diagonale in modo da avere una buona variabilità statistica. Si calcola poi il numero di cellule in base alla seguente formula :

$$n = \frac{nc}{nq} \cdot F \cdot V \cdot 10^4$$

Dove: nc = cellule vitali contate; nq = numero di quadrati contati; F = fattore di diluizione e V = volume in cui sono risospese le cellule.

Test di vitalità cellulare

Il Trypan blue è un colorante utilizzato nei test di determinazione della vitalità cellulare. Questo colorante permette di discriminare tra le cellule vitali e quelle morte in quanto è un colorante in grado di colorare selettivamente le cellule morte. Il motivo per cui questo colorante non colora le cellule vive è da ricercarsi nell'estrema selettività della membrana cellulare. Le cellule vitali, avendo la membrana intatta, non permettono la penetrazione di questo colorante nel citoplasma; al contrario, nelle cellule morte questo penetra facilmente, rendendole distinguibili dalle vive con una rapida analisi al microscopio. Il trypan blue non è in grado di distinguere cellule apoptotiche da cellule necrotiche. Per il conteggio all'emocitometro le cellule sono diluite con colorante in modo da avere un fattore di diluizione

pari a 10 secondo la seguente preparazione: [70µl di α - MEM; 20µl di trypan blue e 10µl di soluzione cellulare]. Si procede ora alla conta di tutte le cellule e di quelle morte (di colore blu). La percentuale di vitalità si ottiene facendo il rapporto tra il numero di cellule vitali ed il numero totale di cellule:

$$\text{vitalità} = \frac{\text{n}^\circ \text{cell vive} \times 100}{\text{n}^\circ \text{cell totali}}.$$

❖ COLTURE DI MACROFAGI

Le cellule CD34⁻ ottenute come residuo dalla separazione immunomagnetica delle CD34⁺ e contenente quindi cellule mononucleate della serie bianca, vengono utilizzate per la coltivazione dei macrofagi in terreno al 90% di RPMI medium e al 10% di siero. Il differenziamento è indotto dalla citochina specifica GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor).

Procedura

- piastare 75×10^6 cellule in 10mL di RPMI al 10% di FBS;
- 2 ore di incubazione a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂;
- 2-3 lavaggi con PRMI non completo;
- 2mL di RPMI completo per staccare le cellule adese;
- conta e analisi al FACS (CD14 per monociti e CD3 per linfociti);
- piastrare 0.5×10^6 cellule/mL e aggiungere la citochine GM-CSF 1µL/mL;
- cambio di metà terreno dopo 3 giorni di coltura;
- stop al 6° giorno di coltura;
- analisi morfologica al microscopio e analisi al FACS (CD14, CD3, dimensioni cellulari).

❖ ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

Estrazione dell'RNA

L'RNA totale viene estratto dalle cellule utilizzando una miscela di guanidina isotiocianato –fenolo – cloroformio, secondo il metodo descritto da Chomczynski – Sacchi. Il protocollo si articola in più fasi: lisi del campione cellulare, separazione di fasi organiche, precipitazione, lavaggio e solubilizzazione dell'RNA.

Lisi del campione cellulare

Le cellule vengono lavate per tre volte con PBS 1x. Per lissarle, il pellet viene risospeso in soluzione denaturante (SolD, 500 μ l/10⁷ cell.) composta da: 4M guanidina tiocianato, 25 mM sodio citrato, pH 7.0, 0.5% laurilsarcosil, 0.1 M β -mercaptoetanololo. La guanidina tiocianato inibisce le ribonucleasi e quindi mantiene l'integrità dell'RNA; come ulteriore precauzione, le soluzioni vengono tenute in ghiaccio.

Separazione di fasi organiche

Alla sospensione ottenuta dopo solubilizzazione con SolD vengono aggiunti sodio acetato 2M, pH 4.5 (50 μ l/500 μ l SolD), fenolo saturato in acqua (400 μ l/500 μ l SolD) e CIAA (cloroformio - alcol isoamilico 24:1 v/v) (100 μ l/500 μ l SolD). La soluzione viene quindi mescolata per inversione e incubata in ghiaccio per 15 minuti. Dopo l'incubazione il campione viene centrifugato per 10 minuti a 10000 rpm a 4°C. In tal modo si formano due fasi: una acquosa superiore e una organica inferiore; l'RNA è contenuto esclusivamente nella fase acquosa, mentre il DNA e le proteine sono presenti nell'interfase e nella fase organica.

Precipitazione dell'RNA

La fase acquosa viene recuperata e trasferita in una nuova eppendorf; l'RNA viene quindi precipitato aggiungendo un volume di isopropanolo pari a quello recuperato (circa 600 μ l) e incubando a -20°C per un'ora. Il campione viene quindi centrifugato per 10 minuti a 13000 rpm a 4°C .

Lavaggio e solubilizzazione dell'RNA

Il pellet viene risospeso in 500 μ l di etanolo al 70% (diluito in acqua trattata con dietilpirocarbonato 7mM per l'inibizione delle ribonucleasi [H₂O-DEPC]) e centrifugato per 10 minuti a 13000 rpm a 4°C . Infine il pellet viene lasciato asciugare all'aria, risospeso in 20 μ l di H₂O-DEPC e conservato a -80°C .

Valutazione della purezza e determinazione della concentrazione dell'RNA

La purezza e l'integrità dell'RNA estratto vengono valutate mediante corsa elettroforetica in gel d'agarosio allo 0.7% (agarosio sciolto in TBE 1X) o mediante analisi del rapporto di assorbanza alle lunghezze d'onda di 260 nm e 280 nm. La preparazione di RNA viene considerata sufficientemente pura se, all'analisi del gel al transilluminatore con luce ultravioletta, è possibile visualizzare tre bande nette corrispondenti rispettivamente all'RNA ribosomale 28S, 18S e 5S; un eccessivo rumore di fondo è indice dell'elevato livello di degradazione dell'RNA. Analogamente la preparazione viene considerata pura se il rapporto 260/280 nm ha un valore compreso tra 1.6 e 1.8; un valore inferiore indica la presenza di contaminanti: proteine o fenolo. La concentrazione del campione di RNA viene determinata mediante analisi spettrofotometrica misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm. Considerando che una densità ottica pari a 1 corrisponde a 40 μ g/ml di RNA, la concentrazione del campione viene calcolata secondo la formula:

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD} \times F \times 40/1000$$

Retrotrascrizione dell'RNA

Gli RNA messaggeri (mRNA), presenti nella soluzione di RNA totale estratto dalle cellule, vengono retrotrascritti in cDNA usando come primers i random examers e come enzima la trascrittasi inversa del Moloney murine leukemia virus (MMLV) prodotta da un ceppo ricombinante di Coli. Per eseguire la retrotrascrizione viene utilizzato il protocollo High Capacity cDNA Reverse Trascrizione kit della Applied Biosystem. A 1 μg di RNA totale vengono aggiunti i reagenti alle concentrazioni finali riportate in tabella 1, in un volume finale di 20 μl (Tabella 1).

Reagenti	Concentrazione finale
Tampone (10X)	50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3
dNTP (x 4)	1 mM (x 4)
Random examers	3 μM
Inibitore delle RNasi	1 U
Trascrittasi inversa	2.5 U
Volume finale	20 μL

Tabella 1 - Reagenti utilizzati per la retrotrascrizione.

Nelle singole provette vengono aggiunti nell'ordine: H₂O, random examers e RNA. Le stesse vengono quindi riscaldate a 70° per 10 minuti con lo scopo di denaturare eventuali strutture secondarie dell'RNA che potrebbero interferire con la retrotrascrizione. Viene poi

aliquotata la restante miscela di reazione e la retrotrascrizione avviene a 25°C per 10 minuti, seguiti da 120 minuti a 37°C e da 5 minuti a 85°C.

❖ **REAL-TIME PCR**

Questa metodica consente di quantificare in tempo reale durante una normale PCR la quantità di RNA presente all'inizio della reazione. A differenza di una normale PCR, che fornisce informazioni solo sul prodotto finale amplificato (PCR a plateau), la Real-Time PCR permette di monitorare anche quello che accade durante la polimerizzazione, in particolare durante la fase esponenziale (Figura 37). Questa tecnica è molto sensibile e si può realizzare mediante l'impiego di coloranti intercalanti aspecifici (SYBR Green), oppure con sonde marcate con molecole fluorescenti (reporter) che si annilano specificatamente al nostro RNA target. In entrambi i casi la Real-Time PCR quantifica la fluorescenza emessa durante ogni ciclo di PCR. In questo studio la Real-Time PCR è stata svolta mediante l'uso di sonde TaqMan. La sonda di tipo TaqMan è un oligonucleotide che, come i due primers della PCR, viene disegnata per essere complementare alla sequenza bersaglio. Presenta all'estremità 5' un fluoroforo REPORTER (FAM in questo caso) e all'estremità 3' una molecola QUENCER (MGB in questo caso). In una configurazione di questo tipo la molecola QUENCER impedisce l'emissione di fluorescenza da parte del REPORTER: nel corso di ogni ciclo di PCR, nella fase di estensione del filamento di DNA complementare alla sequenza bersaglio, l'enzima Taq Polimerasi incontra l'estremità 5' della sonda ed effettua, in un primo momento, uno scalzamento della sonda seguita dal distacco del REPORTER per attività esonucleasica (5'>3'). In questo modo il fluoroforo in soluzione non subisce più l'inibizione del QUENCER ed eccitato dalla lampada alogena emette fluorescenza. In base a questo meccanismo l'intensità della fluorescenza aumenta in funzione della concentrazione

dell'amplificato specifico della reazione. Tutte le coppie di primers utilizzate in questo studio hanno una temperatura di annealing pari a 60°C, mentre le sonde hanno una temperatura di 10°C superiore. Nelle prime sonde prodotte, normalmente di 30-35 bp, il quencer assorbiva ed emetteva contemporaneamente fluorescenza, in quelle di ultima generazione, come quelle usate in questo studio, il quencer è stato sostituito con l'MGB (minor groove binder) che non emette fluorescenza e che si ancora al solco minore del DNA aumentando la temperatura di melting e permettendo di ridurre la lunghezza dell'amplicone.

Preparazione della piastra di Real-Time PCR

Ciascuna piastra per la Real-Time PCR è costituita da 96 pozzetti in cui vengono depositati 22,5 µL di MIX e 2,5 µL di cDNA (da 12,5 a 50 ng).

La MIX viene così preparata per ogni campione:

- ✓ 12,5µL di Universal PCR Master Mix contenente: buffer, Taq Polimerasi, nucleotidi.
- ✓ 8,75µL di H₂O RNAasi free
- ✓ 1,25µL di sonda e primer

La miscela di reazione ha un volume finale di 25µL e per ogni gene da analizzare viene preparata una mix differente. La piastra preparata viene coperta da un adesivo ottico che lascia passare la luce della lampada per eccitare il fluoroforo ma impedisce l'evaporazione dei campioni durante la PCR. La piastra viene in seguito centrifugata a 900 rpm per 5 minuti per eliminare le eventuali bolle formatesi durante la preparazione ed è pronta per l'analisi.

Protocollo di Real-Time PCR

- ✓ 1 ciclo: 95°C per 10' denaturazione iniziale
- ✓ 45 cicli: 95°C per 15'' denaturazione
- ✓ 60°C per 1' annealing ed estensione

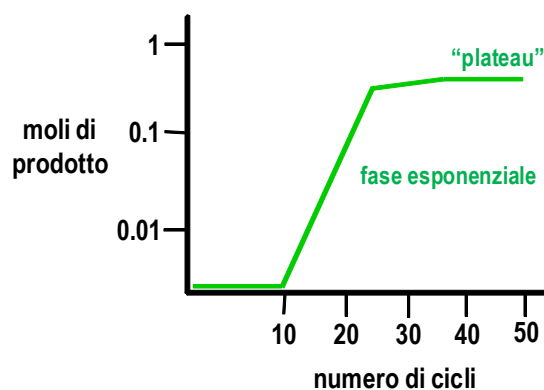


Figura 37 – Curva di amplificazione della PCR.

La fluorescenza viene registrata durante la fase di estensione. Tutte le operazioni relative alle misurazioni ed analisi avvengono sotto il controllo di un software (SYSTEM SDS SOFTWARE) gestito da un personal computer. Il programma calcola automaticamente:

la **linea di base** che indica il n° di cicli in cui lo strumento non registra alcuna fluorescenza;

la **linea soglia**, valore di fluorescenza sotto il quale non si considerano veritieri i dati;

il **ciclo soglia (Ct)**, specifico per ogni campione che identifica il valore del ciclo di PCR in cui la curva in fase esponenziale interseca la linea soglia. Più il campione raggiunge la soglia in minor cicli più è concentrato (Figura 38).

Inoltre il software normalizza i dati dei geni target (nel nostro caso specifico GDF15, HAMP, ferroportina totale FPN e le isoforme della ferroportina FPN1A e FPN1B) rispetto

ai geni endogeni (nel nostro caso specifico GAPDH) e li calibra rispetto ad un valore di riferimento (per il nostro caso il baseline):

- Il $\Delta\Delta Ct$, che è la differenza tra i due ΔCt ($=Ct \text{ target} - Ct \text{ housekeeping}$) rispettivamente del calibratore (baseline) e dei campioni;
- L' RQ ($= 2^{-\Delta\Delta Ct}$) che indica quante volte il gene target è più o meno espresso rispetto al calibratore.

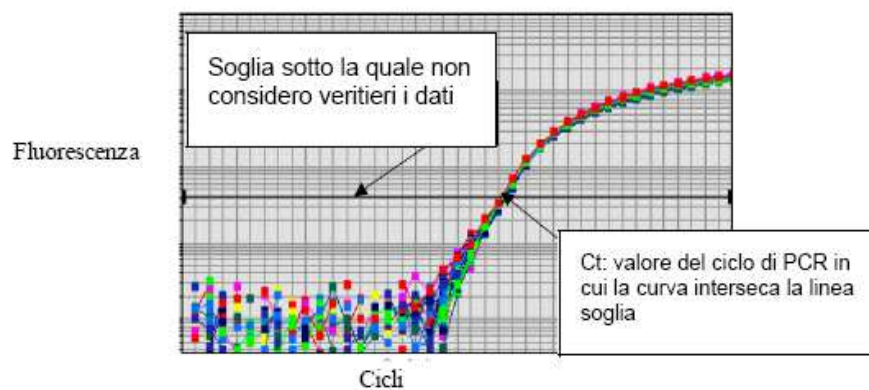


Figura 38 - Amplification plot della Real Time – PCR.

❖ DOSAGGIO PROTEICO

Il kit utilizzato per il dosaggio del GDF15 nei surnatanti è il *DuoSet Sandwich ELISA Kit* (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay della R&D Systems, Minneapolis, MN*).

Procedura

- centrifugare le aliquote di surnatanti, circa 200 μL , per eliminare i residui cellulari;
- allestire una piastra da 96 pozzetti utilizzando per ciascun pozzetto 2 $\mu\text{g/mL}$ di anticorpo monoclonale di topo legante il GDF15 umano;
- aggiungere ad ogni pozzetto la soluzione all'1% di BSA in PBS per neutralizzare i siti aspecifici;

- coprire ed incubare per due ore a temperatura ambiente;
- lavare;
- aggiungere 100µl di detection antibody ad ogni pozzetto;
- coprire ed incubare per due ore a temperatura ambiente;
- lavare;
- aggiungere ad ogni pozzetto 100µl di streptoavidina HPR 1 : 200 (in questo caso si aggiungono 55µl del substrato in 10945µl di reagente);
- coprire ed incubare per 20 minuti a temperatura ambiente evitando la luce diretta;
- lavare la piastra e aggiungere ad ogni pozzetto 100µl di substrate solution;
- incubare per 20 minuti a temperatura ambiente evitando la luce diretta;
- aggiungere 50µl di stop solution e miscelare delicatamente;
- procedere alla lettura a 450 nm con 570 nm di correzione.

La curva standard è generata utilizzando la proteina GDF15 ricombinata.

❖ **COMPOSTI UTILIZZATI**

- **DESFERAL** (desferoxamina mesilato; DFO; Biofutura Pharma S.p.A)

Vengono sciolti 66 mg in 2.5mL di PBS 1X, ottenendo una concentrazione di 40mM, questa viene successivamente diluita alla concentrazione 20mM. Tale soluzione viene aggiunta alle cellule alla concentrazione finale di 10µM e 4 µM. La deferoxamina (DFO) forma complessi prevalentemente con gli ioni di Fe e Al trivalenti: le costanti di formazione dei complessi sono rispettivamente 1031 e 1025. L'affinità della DFO per gli ioni bivalenti come Fe⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Ca⁺⁺ è sostanzialmente minore (costante di formazione del complesso 1014 o inferiore). La chelazione avviene con rapporto molare 1:1, vale a dire che 1 g di DFO può teoricamente legare 85 mg di ferro trivalente o 41 mg di alluminio trivalente. Grazie alle sue proprietà chelanti, la DFO può legare il ferro libero

sia quello nel plasma che nelle cellule, formando il complesso ferriossamina (FO). L'escrezione urinaria di FO deriva soprattutto dal turnover del ferro plasmatico, mentre il ferro presente nelle feci riflette soprattutto la chelazione intraepatica. Il ferro può essere chelato dalla ferritina e dall'emosiderina, ma è relativamente basso a concentrazioni di DFO clinicamente rilevanti. La DFO non mobilizza, però, il ferro contenuto nella transferrina, nell'emoglobina od in altre sostanze contenenti un gruppo eme.

- FERRO AMMONIO CITRATO (FeAmCit FAC; Sigma)

Vengono sciolti 650 mg in 5mL di PBS 1X, ottenendo una concentrazione di 0.4M, questa viene successivamente diluita alla concentrazione 20mM. Tale soluzione viene aggiunta alle cellule alla concentrazione finale di 100µM.

❖ **ANALISI AL CITOFLUORIMETRO DEL FERRO INTRACELLULARE**

L'analisi al citofluorimetro consente di determinare l'espressione di marcatori di membrana mediante marcatura con anticorpi specifici. In particolare, in questo lavoro, per quantificare il ferro intracellulare è stato utilizzato come marcatore di membrana il recettore della transferrina (TfR) CD71. Il quantitativo di recettore presente sulla membrana cellulare è proporzionale al contenuto di ferro presente all'interno della cellula: una carenza di ferro porta ad un aumento del recettore in quanto il TfR media la captazione del ferro da parte delle cellule, mentre l'effetto opposto si ha in caso di sovraccarico di ferro. Le cellule al 14° giorno di coltura vengono lavate con soluzione salina fosfato (phosphate-buffered saline PBS, GIBCO) e risospese alla concentrazione di 10^5 cellule/µl. Per l'analisi del marcatore di membrana le cellule vengono incubate per 15 minuti a 4°C con l'anticorpo antiCD71 (FITC ficocianina). Se le cellule provengono dal terreno di coltura prima della marcatura avviene un'incubazione per 15 minuti a 4°C con PBS

arricchita contenente: MS Mouse Serum 4%, NCS NewBorn Catt Serum 4% e Sodio Azide NaN_3 0,1%. Tale procedura serve per saturare eventuali siti aspecifici che potrebbero impedire la corretta marcatura con gli opportuni anticorpi. L'analisi viene effettuata con un citofluorimetro a 6 colori (FACSCANTO Becton Dickinson) dotato di 2 laser con lunghezza d'onda di 488 nm per il laser blue e 635 nm per quello rosso utilizzando il software FACS DIVA 5 (Tabella 2).

Anticorpo	Laser di eccitazione	Spettro di emissione
CD71	488 nm	519 nm

Tabella 2 - Lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione al FACS del CD71.

RISULTATI

❖ ANALISI DEL GDF15 DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO ERITROIDE IN COLTURE CONTROLLO

Cellule CD34⁺ provenienti da donatori sani sono state coltivate in condizioni che stimolano il differenziamento eritroide. Il medium di coltura contiene, infatti, citochine come lo stem cell factor (SCF), interleuchina 3 (IL-3) e eritropoietina (Epo). Le cellule vengono coltivate per 14 giorni. Le cellule sono state analizzate a giorni diversi di coltura per valutare crescita e vitalità cellulare, morfologia, espressione genica e dosaggio proteico. Le cellule crescono in modo esponenziale durante le due settimane di coltura e la vitalità è elevata per tutto il periodo del differenziamento cellulare (96% di vitalità). Morfologicamente al 14° giorno di coltura si osservano eritroblasti maturi (Figura 39).

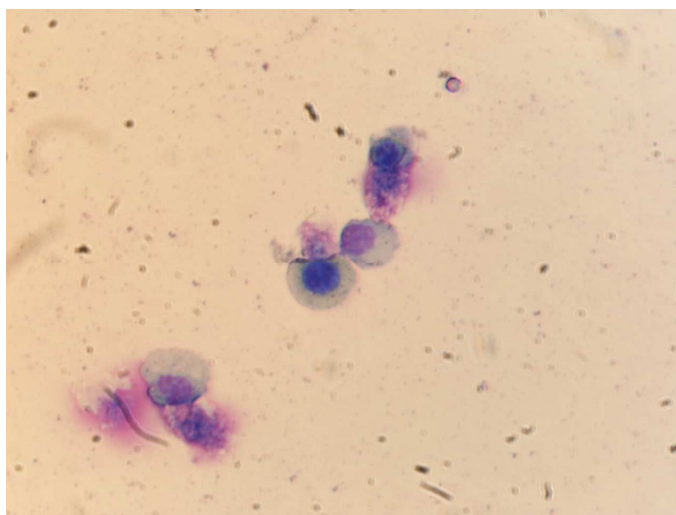


Figura 39 - Eritroblasti maturi al giorno 14 di coltura.

Analisi molecolare

L'espressione genica del GDF15 è stata valutata ai giorni di coltura 0, 4, 7, 11, 14 attraverso la metodica della *real - time PCR* a partire dal cDNA ottenuto per retrotrascrizione dell'RNA estratto dalle cellule controllo. I risultati dell'analisi vengono convertiti in grafici che spiegano quando e in quali quantità il nostro gene di interesse viene espresso durante il differenziamento rispetto ad un gene endogeno (*housekeeping*), che in questo caso è il GAPDH. I valori vengono riportati come $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct =$ differenza tra i Ct dei campioni analizzati e il Ct del calibratore) che indica il valore assoluto di quante volte il gene è espresso ad ogni stadio del differenziamento.

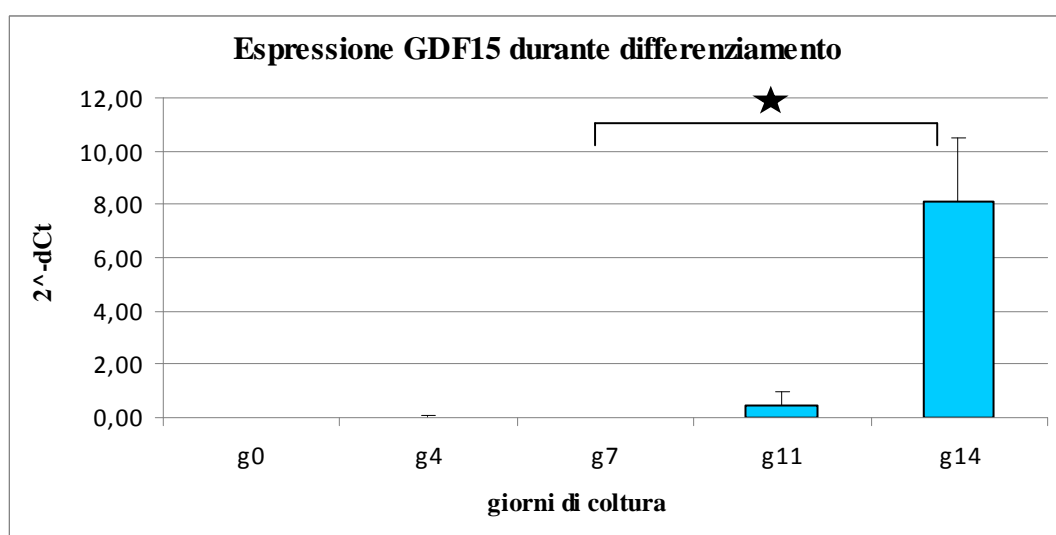


Grafico 1- Espressione genica del GDF15 durante il differenziamento.

Dal grafico si osserva che l'espressione del GDF15 è molto bassa ai primi giorni di coltura e aumenta a partire dal giorno 11 (eritroblasti policromatofili) per poi crescere in maniera considerevole al giorno 14 (eritroblasti maturi). L'aumento di espressione del GDF15 dal giorno 7 al giorno 14 di coltura risulta statisticamente significativo ($\star p < 0.001$).

Analisi proteica

Il dosaggio proteico della citochina rilasciata nel surnatante di colture controllo è stato ottenuto mediante misurazione ELISA ed il rilevamento è stato eseguito ai giorni 7 e 14 del differenziamento eritroide.

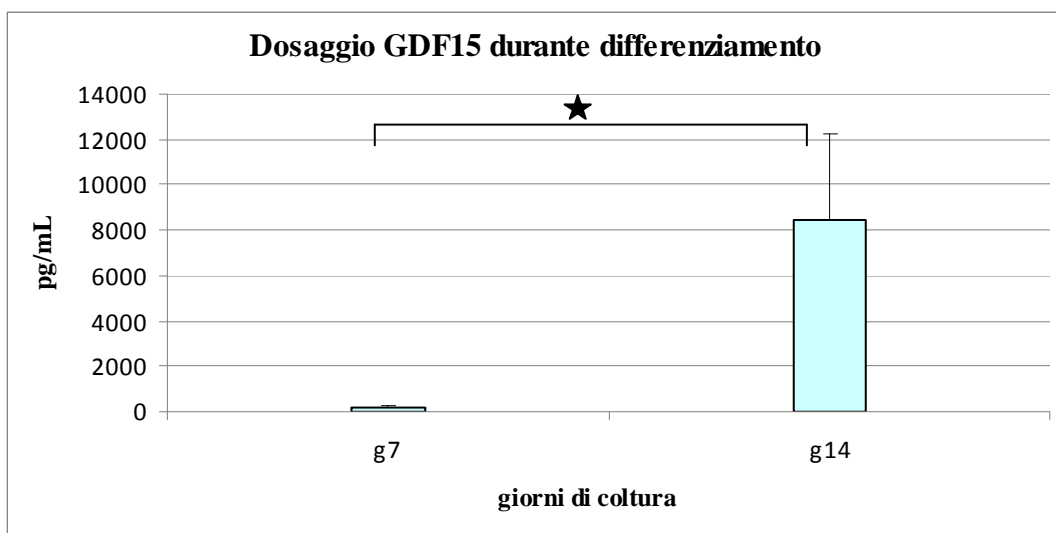


Grafico 2- Dosaggio del GDF15 al giorno 7 e 14 di coltura.

Il grafico conferma l'andamento osservato nell'espressione genica del GDF15: vi è un notevole aumento della secrezione della citochina al giorno 14 di coltura. L'aumento rilevato rispetto al giorno 7 di coltura è statisticamente significativo (★ $p < 0.05$).

❖ **ANALISI GENICA E PROTEICA DEL GDF15: CONFRONTO TRA COLTURE CONTROLLO, TM E TI DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO ERITROIDE**

Cellule CD34⁺ provenienti da donatori sani e pazienti talassemici major (TM) e intermedi (TI), sono state coltivate in condizioni che stimolano il differenziamento eritroide. Il medium di coltura contiene infatti lo stem cell factor (SCF), l'interleuchina 3 (IL-3) e l'eritropoietina (Epo). Le cellule vengono coltivate per 14 giorni e analizzate a giorni diversi di coltura per valutare l'espressione genica e il dosaggio proteico. Il reclutamento dei pazienti talassemici major e intermedi è avvenuto in collaborazione con il DH del centro anemie congenite coordinato dalla prof.ssa MD Cappellini (Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico di Milano). Sia i pazienti TM che i pazienti TI sono stati scelti tra loro con lo stesso genotipo (cod39/cod39 per i pazienti TM e IVS1-6/IVS1-6 per i pazienti TI) e con parametri ematologici simili (emoglobina, globuli rossi, volume corpuscolare medio MCV, distribuzione dei volumi eritrocitari RDW, contenuto medio di emoglobina per globulo rosso MCH, reticolociti) al fine di poter rendere paragonabili i dati ottenuti.

Analisi molecolare

L'espressione genica del GDF15 è stata valutata in colture controllo, TM e TI ai giorni 0, 7, 14 di coltura. I risultati sono espressi come $2^{-\Delta Ct}$.

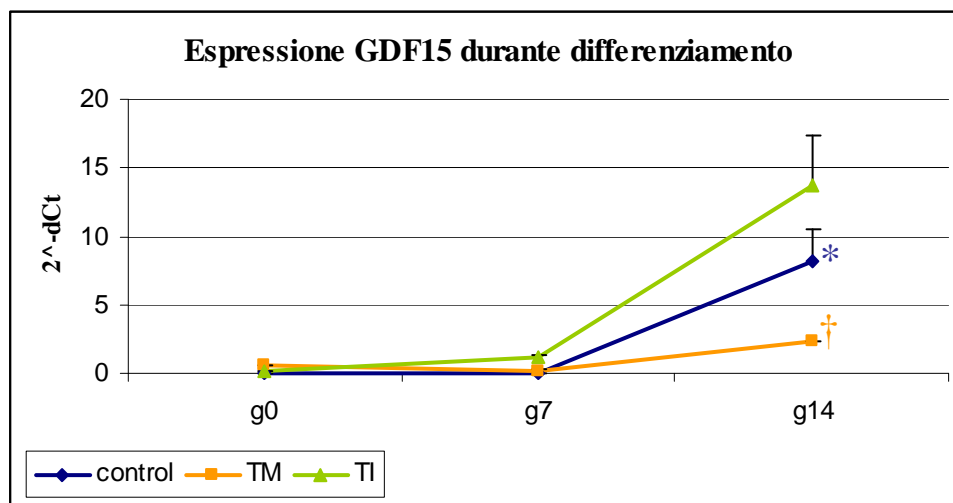


Grafico 3- Espressione genica del GDF15 in cellule controllo, TM e TI durante il differenziamento eritroide.

Il grafico mostra un profilo di espressione del GDF15 in progressivo aumento durante la maturazione e il differenziamento eritroide sia in cellule controllo che TM che TI. L'aumento di espressione del GDF15 dal giorno 7 al giorno 14 di coltura risulta statisticamente significativo sia per il controllo (* $p < 0.001$) che per il TM († $p < 0.02$). Spostando l'attenzione al 14° giorno di coltura osserviamo livelli di espressione del GDF15 maggiore per le cellule TI rispetto alle cellule controllo e TM.

Analisi proteica

La quantità di GDF15 secreto nel surnatante dalle cellule controllo, TM e TI è stata valutata ai giorni 7 e 14 di coltura mediante test ELISA.

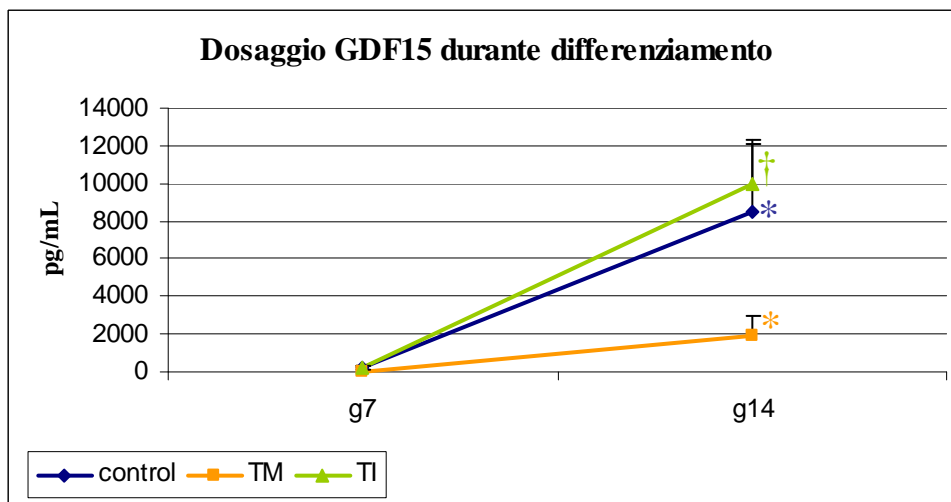


Grafico 4- Dosaggio del GDF15 in cellule controllo, TM e TI durante il differenziamento eritroide.

Il grafico evidenzia un aumento della secrezione della proteina dal giorno 7 al giorno 14 sia per le cellule TI che controllo che TM anche se l'incremento è maggiore per le prime due. Al 14° giorno di coltura il GDF15 è più secreto dalle cellule TI, seguono le cellule controllo ed infine le cellule TM. I valori proteici della secrezione confermano quanto osservato nel grafico precedente con l'analisi molecolare. Inoltre l'aumento di secrezione (giorno 7 vs giorno 14) è statisticamente significativo sia per le cellule controllo (* $p < 0.05$), che per le cellule TM (* $p < 0.05$), che per cellule TI († $p < 0.03$).

❖ **ANALISI GENICA DELL'EPICIDINA (HAMP): CONFRONTO TRA COLTURE CONTROLLO, TM E TI DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO ERITROIDE**

Cellule CD34⁺ provenienti da donatori sani e pazienti talassemici major (TM) e intermedi (TI), sono state coltivate in condizioni precedentemente descritte. Le cellule vengono coltivate per 14 giorni e analizzate a giorni diversi di coltura per valutare l'espressione genica.

Analisi genica

L'espressione genica dell'epcidina è stata valutata in colture controllo, TM e TI ai giorni 0, 4, 7, 11 e 14 di coltura. I risultati sono espressi come $2^{-\Delta Ct}$.

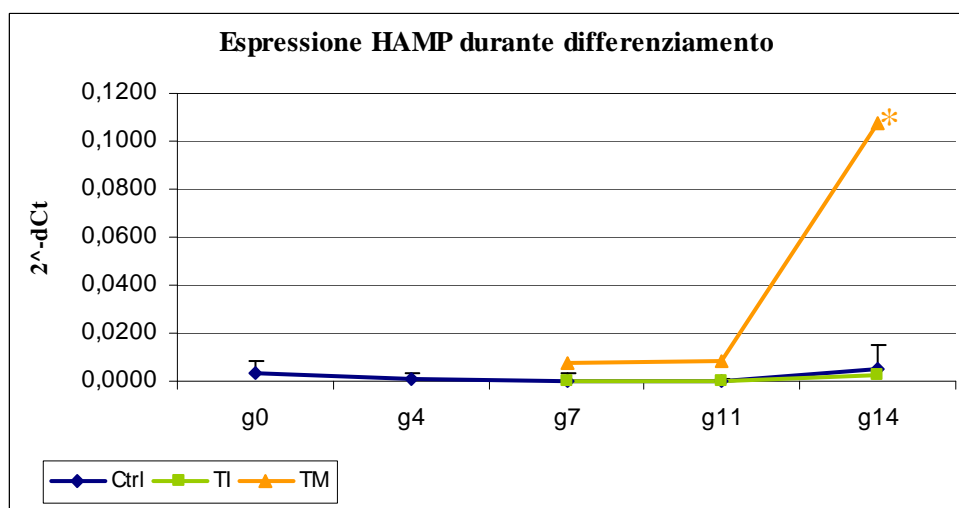


Grafico 5- Espressione genica dell'HAMP in cellule controllo, TM e TI durante il differenziamento eritroide.

Il grafico mostra un profilo di espressione dell'epcidina costante e comunque molto basso durante il differenziamento eritroide sia in cellule controllo che TI. Risulta invece evidente

e significativo (* $p < 0.00002$) l'aumento di espressione del gene al giorno 14 di coltura in cellule TM.

❖ ANALISI DEL GDF15 IN COLTURE CONTROLLO, TM E TI TRATTATE CON DFO E CON FAC

Valutazione proliferazione e vitalità

Le cellule CD34⁺ sono coltivate in condizioni precedentemente descritte. Al giorno 0 di coltura vengono aggiunti o il FeAmCit (FAC) alla concentrazione di 100 μ M o il chelante del ferro deferoxamina DFO (nome commerciale desferal) alla concentrazione di 4 μ M. Quando in una coltura vengono introdotti farmaci o composti chimici come in questo caso, la valutazione della crescita e della vitalità sono importanti per garantire che l'effetto dei diversi composti sulle cellule non sia dovuto alla loro tossicità ma alle loro proprietà. Si comprende come tale valutazione diventi ancor più importante quando i composti entrano in contatto con delle cellule patologiche come nel nostro caso. I grafici che seguono rappresentano l'andamento della crescita e della vitalità di cellule controllo (Grafico 6), TM (Grafico 7) e TI (Grafico) trattate con DFO e FAC.

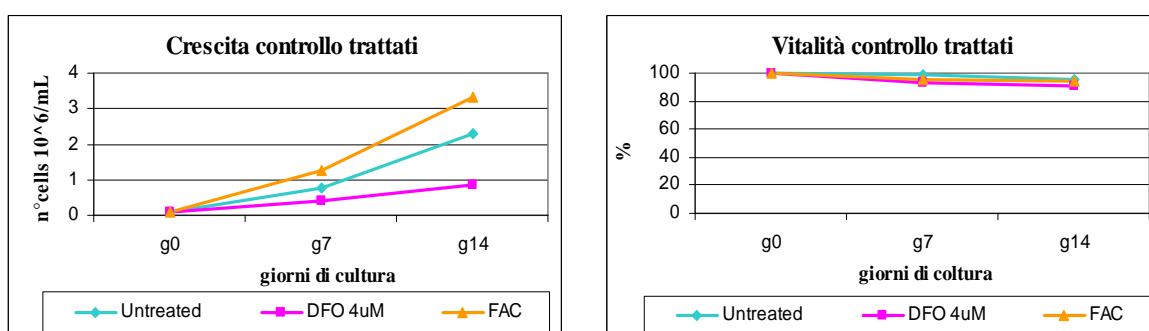


Grafico 6- Valutazione della crescita e vitalità cellulare di colture controllo trattate con DFO e FAC.

Dal grafico 6 si può osservare come tutte le condizioni presentino un andamento crescente della crescita cellulare durante tutto il differenziamento; in particolare la condizione con l'aggiunta di FAC ha una crescita superiore rispetto al controllo non trattato, mentre quella con l'aggiunta di DFO ha una crescita minore. Per quanto riguarda la vitalità non si osservano differenze tra il controllo non trattato e i controlli trattati. Infatti, il range in toto della coltura rientra tra il 100 e l'90% di vitalità.

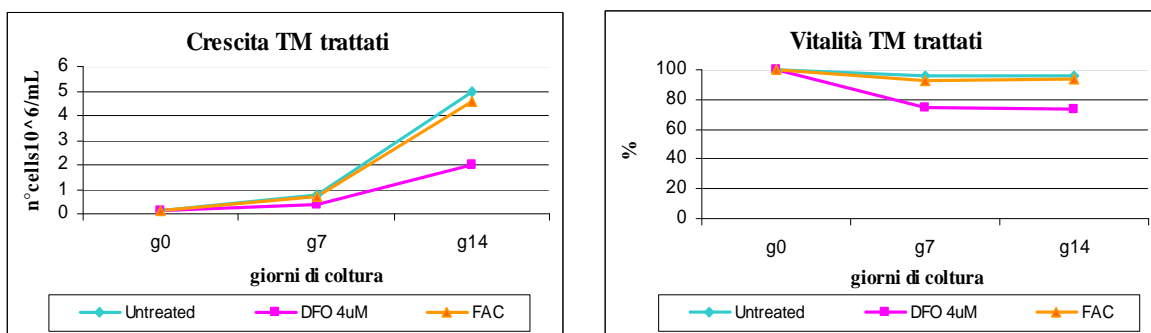


Grafico 7- Valutazione della crescita e vitalità cellulare di colture TM trattate con DFO e FAC.

Per quanto riguarda la crescita cellulare in TM osserviamo un andamento crescente per tutte e tre le condizioni ma mentre il trattato con FAC cresce in modo del tutto paragonabile al non trattato, il trattato con DFO cresce molto meno. La vitalità è sovrapponibile nel non trattato e nel trattato con FAC, si nota invece una diminuzione nei trattati con DFO (75% di vitalità).

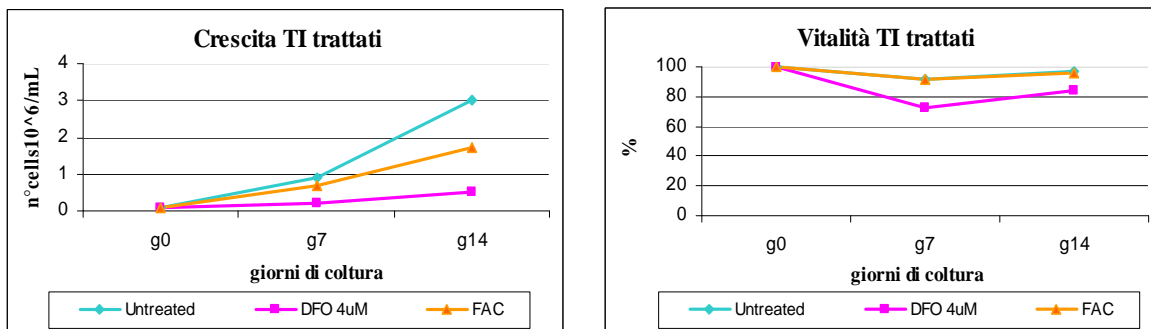


Grafico 8- Valutazione della crescita e vitalità cellulare di colture TI trattate con DFO e FAC.

Per quanto riguarda la crescita cellulare in TI osserviamo un andamento crescente per tutte e tre le condizioni con valori comunque più alti nel non trattato rispetto ai trattati. La vitalità è sovrapponibile nel non trattato e nel trattato con FAC, si nota solo una piccola diminuzione nei trattati con DFO (80% di vitalità).

Analisi genica

L'espressione del GDF15 è stata valutata al giorno 14 di coltura in cellule controllo, TM e TI trattate con DFO o con FAC. I risultati sono espressi come $2^{-\Delta Ct}$.

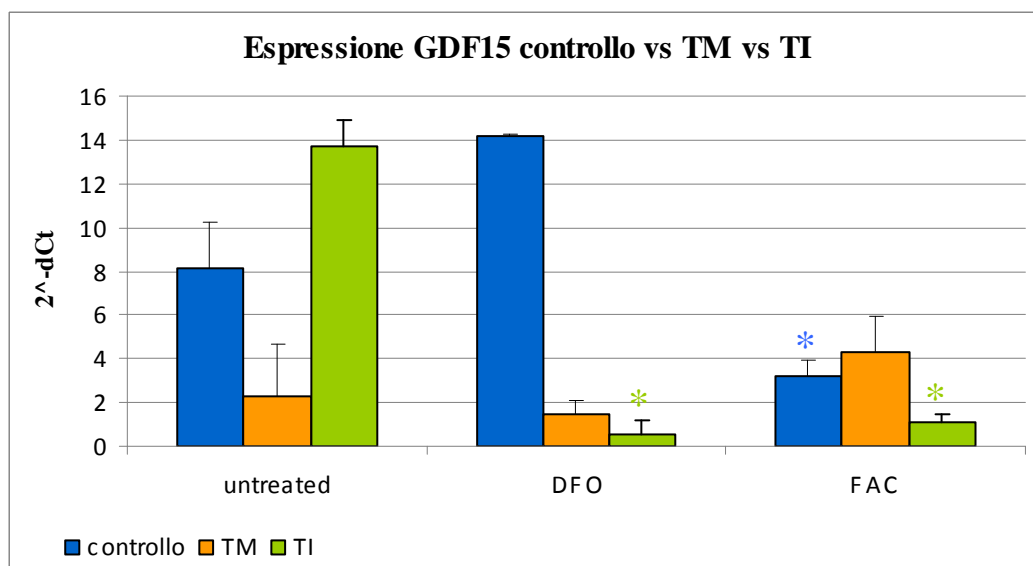


Grafico 9- Espressione del GDF15 al giorno 14 di cellule controllo, TM e TI trattate con DFO4 e FAC.

Dal grafico si osserva che l'espressione del GDF15 nelle cellule controllo è aumentata in situazioni di ferro deplezione (DFO) mentre diminuisce in modo statisticamente significativo (* $p < 0.05$) in situazioni di ferro saturazione (FAC) rispetto al non trattato. Nelle cellule TM l'espressione del GDF15 diminuisce se si aggiunge DFO mentre aumenta se si aggiunge FAC rispetto al non trattato. Nelle cellule TI, infine, sia il DFO che il FAC inducono una diminuzione significativa (* $p < 0.05$) dell'espressione del GDF15 rispetto alle cellule non trattate.

Analisi proteica

La quantità di GDF15 secreto nel surnatante dalle cellule controllo, TM e TI trattate con il chelante e con il ferro è stata valutata al giorno 14 di coltura mediante test ELISA.

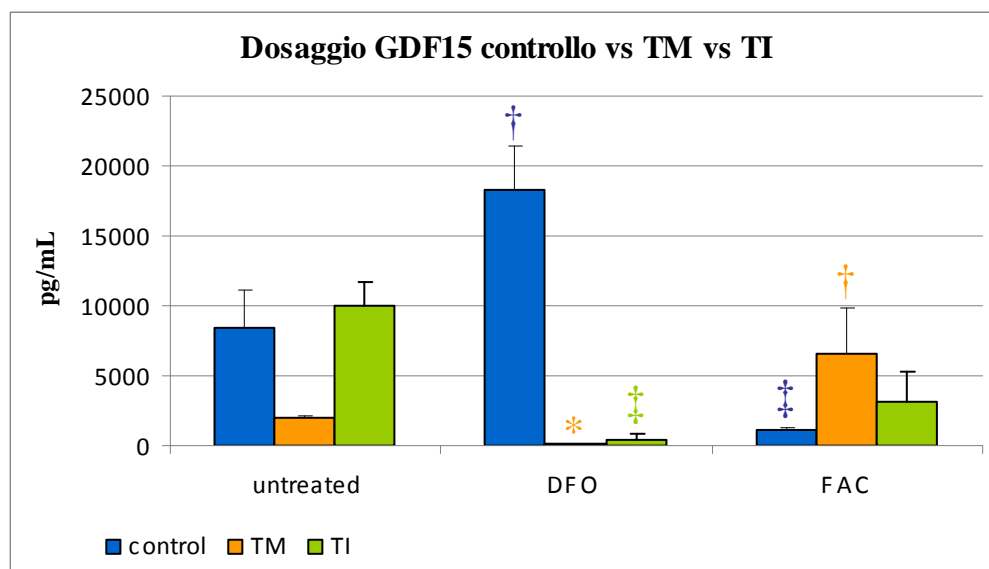


Grafico 10- Dosaggio del GDF15 al giorno 14 di cellule controllo, TM e TI trattate con DFO4 e FAC.

Dal grafico si osserva che la secrezione del GDF15 in cellule controllo aumenta in modo statisticamente significativo († $p < 0.005$) se trattate con DFO, mentre diminuisce significativamente (‡ $p < 0.01$) se trattate con FAC. Al contrario, nelle cellule TM il GDF15 diminuisce in modo statisticamente significativo (* $p < 0.0000006$) in situazioni di ferro deplezione (DFO), mentre aumentata significativamente († $p < 0.003$) in situazioni di ferro saturazione (FAC) rispetto al non trattato. Nelle cellule TI sia il DFO (‡ $p < 0.01$) che il FAC inducono una diminuzione della secrezione del GDF15 rispetto alle cellule non trattate.

❖ **ANALISI MOLECOLARE DELLA FERROPORTINA TOTALE FPN E DELLE ISOFORME FPN1A E FPN1B IN COLTURE CONTROLLO, TM E TI DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO ERITROIDE**

Cellule CD34⁺ provenienti da donatori sani e pazienti talassemici major (TM) e intermedi (TI), sono state coltivate in condizioni precedentemente descritte. Le cellule vengono coltivate per 14 giorni e analizzate a tempi diversi di coltura (giorno 0, 7 e 14) per valutare l'espressione genica questa volta della ferroportina totale (FPNTOT) e delle due diverse isoforme (FPN1A e FPN1B rispettivamente con e senza la sequenza responsiva al ferro IRE) durante il differenziamento eritroide.

Analisi molecolare

L'espressione della ferroportina totale è stata valutata al giorno 0, 7 e 14 di coltura in cellule controllo, TM e TI. I valori vengono riportati come $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ che indica il valore assoluto di quante volte il gene è espresso ad ogni stadio del differenziamento. Successivamente l'attenzione è stata focalizzata solo sulle due diverse isoforme della ferroportina e si è scelto di rappresentarle come quota di espressione rispetto alla FPNTOT.

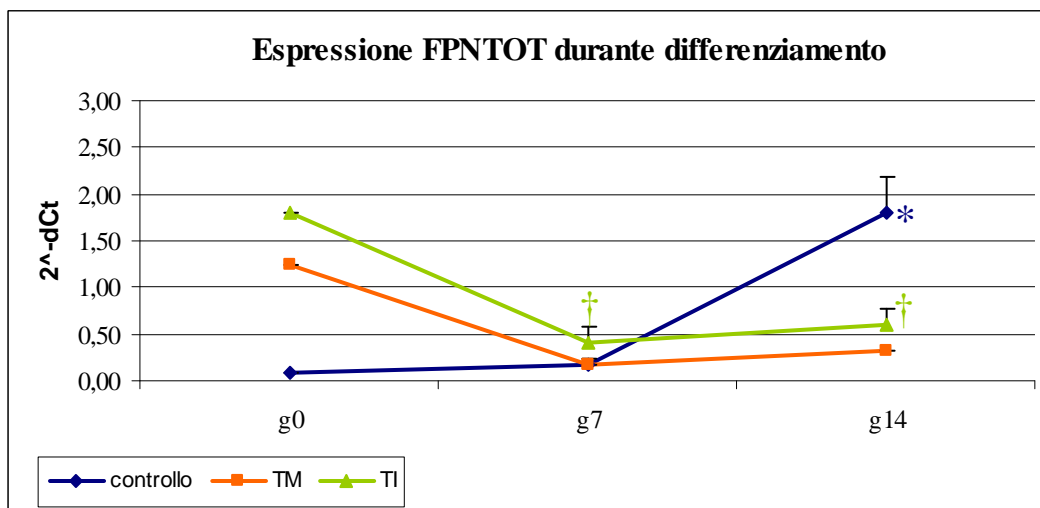


Grafico 11- Espressione della FPNTOT in cellule controllo, TM e TI durante il differenziamento eritroide.

Dal grafico osserviamo come l'espressione della ferroportina totale in cellule controllo sia bassa negli stadi iniziali del differenziamento eritroide (g0 e g7), per poi aumentare in modo statisticamente significativo (* $p < 0.01$) a livello degli eritroblasti maturi (g14). Le cellule TM esprimono molta FPNTOT al giorno 0 di coltura per poi diminuire a metà del processo di differenziamento e mantenersi piuttosto bassa anche alla fine (g14). Nelle cellule TI l'espressione della FPNTOT è alta al giorno 0 e poi diminuisce in modo significativo al giorno 7 († $p < 0.003$) e 14 († $p < 0.003$).

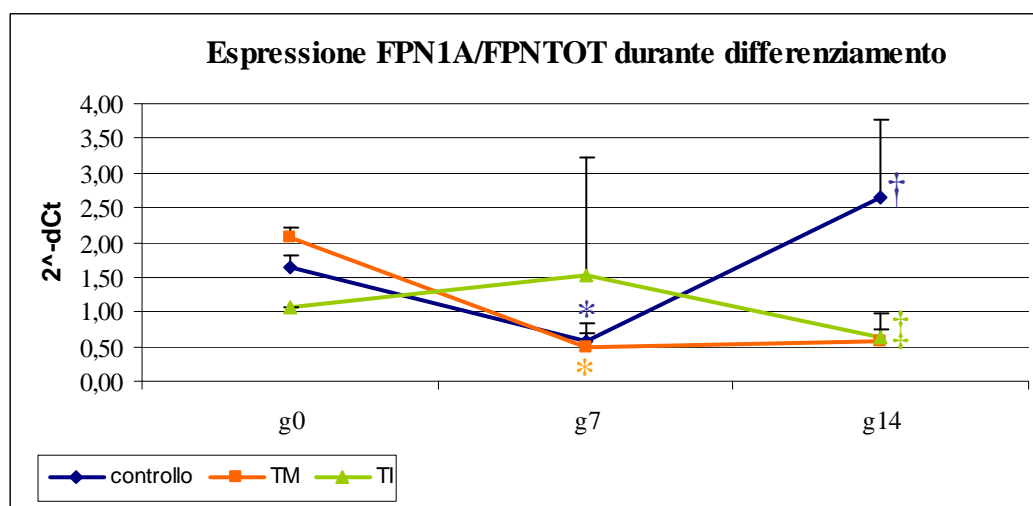


Grafico 12- Espressione della FPN1A/FPNTOT in cellule controllo, TM e TI durante il differenziamento eritroide.

Dal grafico osserviamo come l'espressione della FPN1A/FPNTOT in cellule controllo sia alta negli stadi iniziali del differenziamento eritroide (g0), per poi diminuire in modo statisticamente significativo (* $p < 0.001$) a livello degli eritroblasti (g7) e tornare ad essere nuovamente molto espressa († $p < 0.01$) con il completamento del differenziamento eritroide (g14). Anche nelle cellule TM l'isoforma 1A è espressa al giorno 0 di coltura per poi diminuire in modo significativo (* $p < 0.001$) a metà del processo di differenziamento ma, a differenza del controllo, nel TM i livelli di FPN1A si mantengono bassi anche alla fine (g14). Infine, nelle cellule TI l'andamento della isoforma 1A è esattamente opposto al controllo: quindi è poco espressa al giorno 0, per aumentare al giorno 7 e poi diminuire in modo significativo (‡ $p < 0.05$) alla fine del differenziamento eritroide.

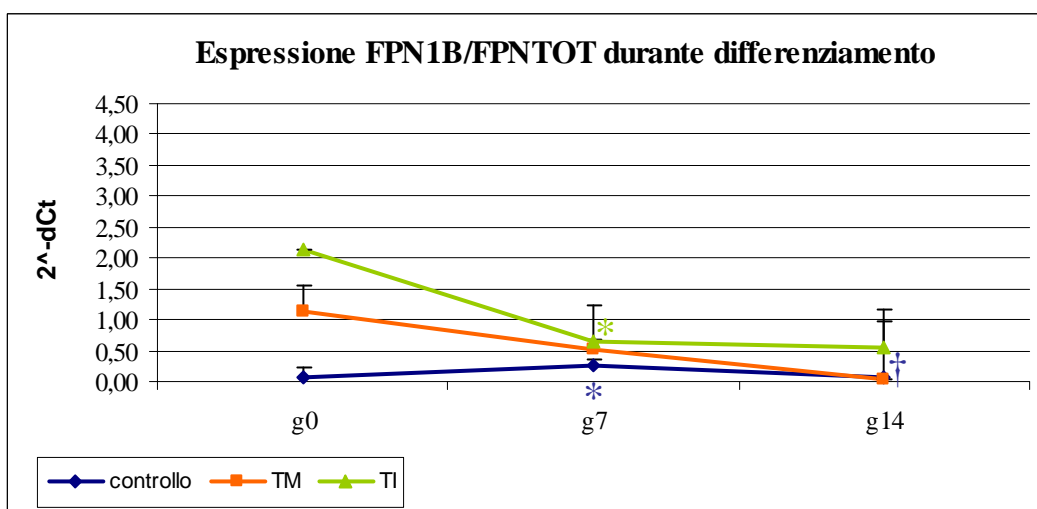


Grafico 13- Espressione della FPN1B/FPNTOT in cellule controllo, TM e TI durante il differenziamento eritroide.

Il profilo di espressione dell'isoforma 1B mostra il seguente andamento: nelle cellule controllo l'espressione è bassa al giorno 0, per poi aumentare in modo statisticamente significativo (* $p < 0.01$) al giorno 7 e diminuire in modo altrettanto significativo al 14° giorno di coltura († $p < 0.00003$). Nelle cellule TM FPN1B è molto espressa negli stadi iniziali della maturazione per poi diminuire bruscamente al giorno 7 e ancora al giorno 14. Le cellule TI mostrano un profilo di espressione simile alle cellule TM, infatti l'FPN1B è molto espressa al giorno 0 anche se con valori inferiori rispetto al TM, diminuisce in modo significativo (* $p < 0.01$) al giorno 7 per poi mantenersi costante con il completamento del differenziamento eritroide. Da notare come i valori della FPN1B al 14° giorno di coltura TI siano comunque più alti rispetto alle cellule controllo e TM.

❖ **ANALISI MOLECOLARE DELLA FERROPORTINA TOTALE FPN E DELLE ISOFORME FPN1A E FPN1B IN COLTURE CONTROLLO, TM E TI TRATTATE CON DFO E FAC**

Le cellule CD34⁺ sono coltivate in condizioni precedentemente descritte. Al giorno 0 di coltura vengono aggiunti o il ferro-ammonio-citrato (FAC) alla concentrazione di 100µM o il chelante del ferro deferoxamina (DFO) alla concentrazione di 4µM. L'espressione genica della ferroportina totale e delle due isoforme è stata valutata al giorno 14 di coltura.

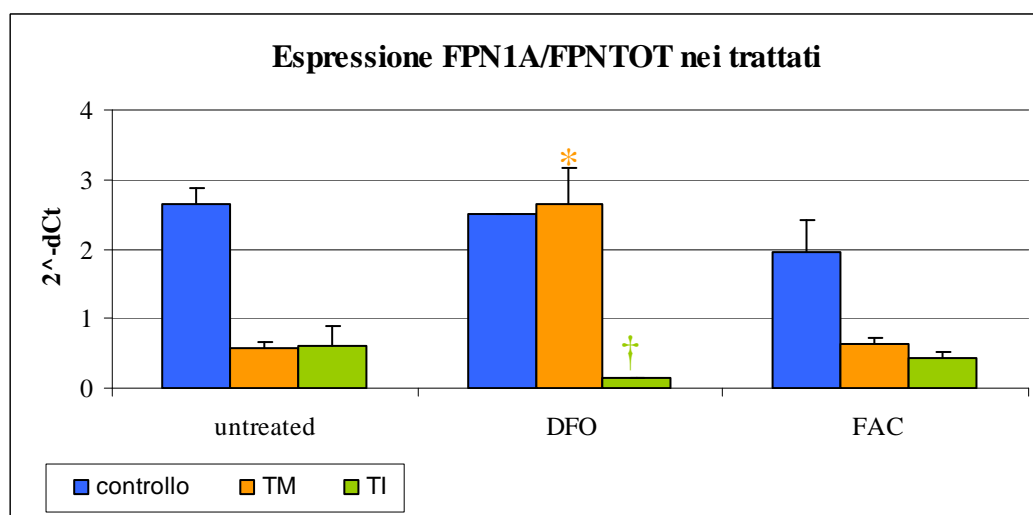


Grafico 14- Espressione della FPN1A/FPNTOT in cellule controllo, TM e TI trattate con DFO e FAC.

Nelle cellule controllo l'aggiunta di DFO non introduce importanti variazioni, mentre l'aggiunta di FAC provoca una lieve diminuzione di espressione della FPN1A. Nelle cellule TM l'espressione della FPN1A/FPNTOT aumenta significativamente rispetto alle cellule non trattate se aggiungiamo DFO (* $p < 0.04$) mentre rimane invariata se aggiungiamo FAC. In cellule TI l'isoforma 1A diminuisce sia in condizioni di ferro

deplezione che in condizioni di ferro saturazione. La diminuzione è significativa con l'aggiunta di DFO ($\dagger p < 0.05$).

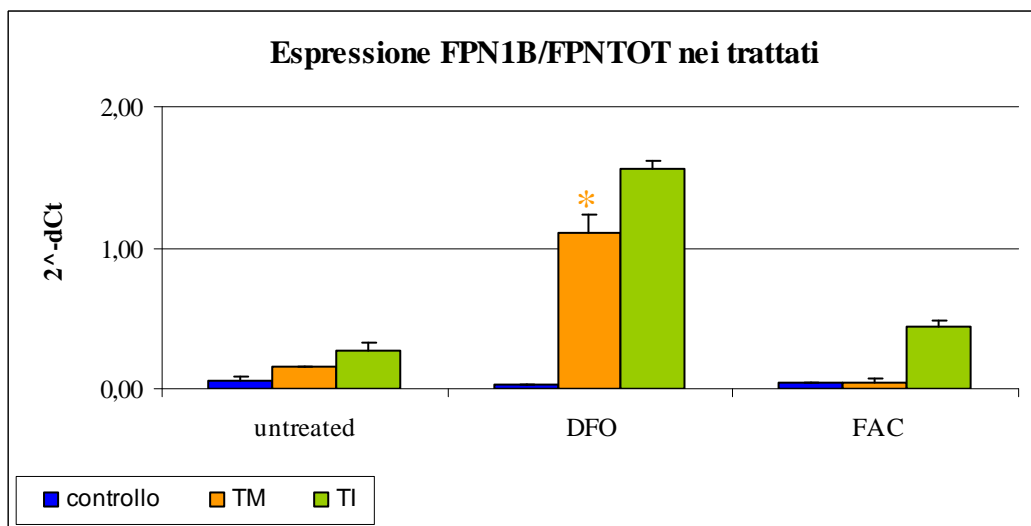


Grafico 15- Espressione della FPN1B/FPNTOT in cellule controllo, TM e TI trattate con DFO e FAC.

Nelle cellule controllo l'espressione della FPN1B/FPNTOT non subisce modifiche né in presenza di DFO, né in presenza di FAC ed è comunque molto bassa. FPN1B aumenta in modo significativo (* $p < 0.001$) nelle cellule TM trattate con DFO rispetto alle cellule non trattate, mentre diminuisce lievemente di espressione in presenza di FAC. Infine nelle cellule TI sia la somministrazione di DFO che di FAC aumenta l'espressione dell'isoforma 1B rispetto alle cellule non trattate.

❖ ANALISI DEL GDF15 IN MACROFAGI CONTROLLO, TM E TI TRATTATI CON DFO E FAC

Cellule CD34⁻ provenienti da donatori sani e pazienti talassemici major (TM) e intermedi (TI), sono state coltivate in condizioni che stimolano il differenziamento dei macrofagi. Il

medium di coltura contiene infatti una citochina specifica per la maturazione dei macrofagi GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor). Le cellule vengono coltivate per 6 giorni quando si ottengono macrofagi maturi.

Analisi molecolare

L'espressione genica del GDF15 è stata valutata attraverso *real-time PCR* a partire dal cDNA ottenuto per retrotrascrizione dell'RNA estratto dai macrofagi di ciascuna condizione. I risultati dell'analisi vengono convertiti in grafici che spiegano quando e in quali quantità il nostro gene di interesse viene espresso rispetto al gene endogeno GAPDH. I valori vengono riportati come $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ che indica il valore assoluto di quante volte il gene è espresso.

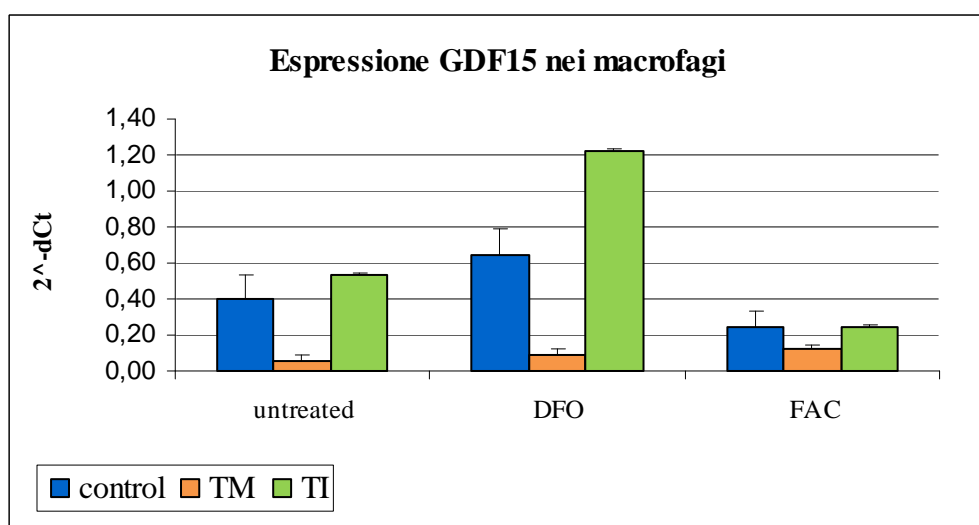


Grafico 16- Espressione genica del GDF15 in macrofagi controllo, TM e TI trattati con DFO e FAC.

Il grafico mostra come i macrofagi controllo e TI trattati con il chelante (DFO) aumentano i livelli di espressione del GDF15 rispetto ai macrofagi non trattati, mentre l'aggiunta di FAC comporta una diminuzione di espressione del gene. Nei macrofagi TM invece il GDF15 non subisce variazioni sia aggiungendo DFO che FAC.

Analisi proteica

Il dosaggio proteico della citochina rilasciata nel surnatante di coltura è stato ottenuto mediante misurazione ELISA ed il rilevamento è stato eseguito al giorno 6 quando i macrofagi sono maturi e differenziati.

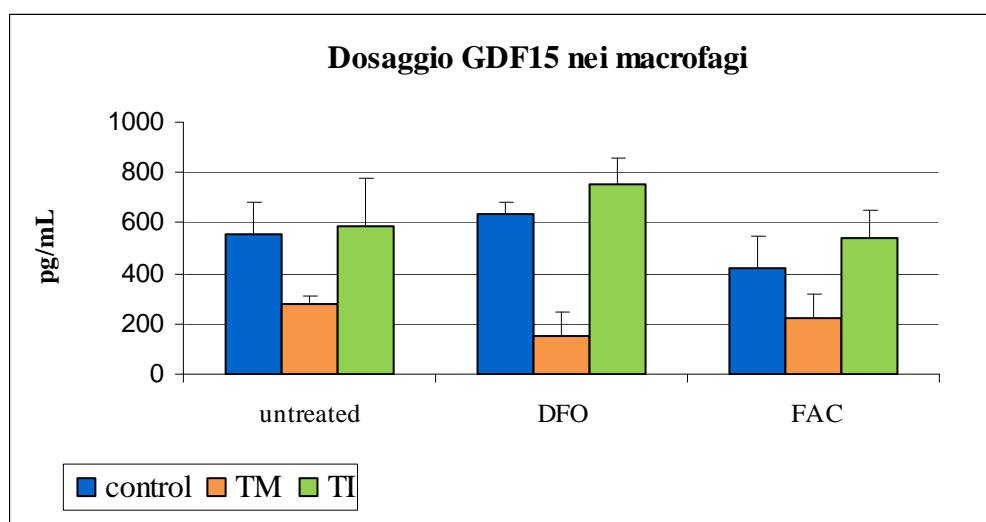


Grafico 17- Espressione proteica del GDF15 in macrofagi controllo, TM e TI trattati con DFO e FAC.

Il dosaggio proteico mostra lo stesso andamento dell'analisi molecolare: i macrofagi controllo e TI in condizioni di ferro deplezione rilasciano più citochina rispetto ai non trattati, mentre in condizioni di ferro saturazione il rilascio è minore. I macrofagi TM invece rilasciano circa la stessa quantità di GDF15 sia in presenza di DFO che di FAC rispetto ai non trattati.

❖ **ANALISI MOLECOLARE DELLA FERROPORTINA TOTALE FPN E DELLE ISOFORME FPN1A E FPN1B IN MACROFAGI CONTROLLO, TM E TI TRATTATI CON DFO E FAC**

Le cellule CD34⁺ provenienti da donatori sani e pazienti talassemici major (TM) e intermedi (TI) sono state coltivate in condizioni precedentemente descritte.

Analisi molecolare

L'espressione della ferroportina è stata valutata al 6° giorno di coltura, quando i macrofagi sono oramai differenziati. I valori vengono riportati come $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ che indica il valore assoluto di quante volte il gene è espresso. In particolare si è scelto di rappresentare la quota di espressione delle diverse isoforme (FPN1A e FPN1B) rispetto a quella della ferroportina totale (FPNTOT).

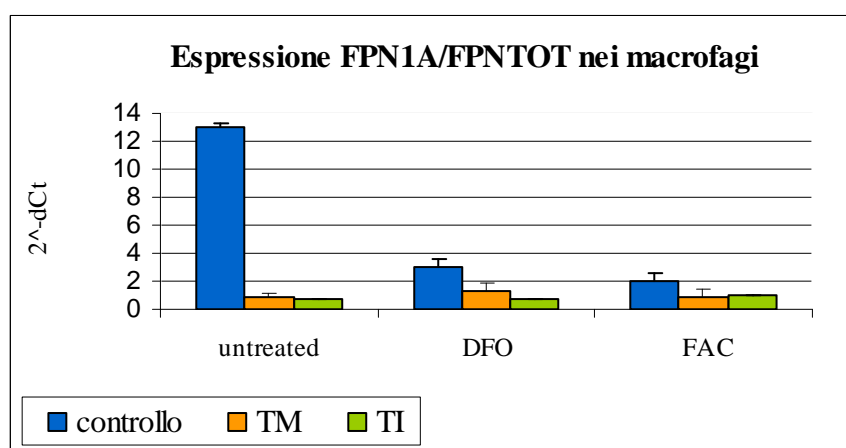


Grafico 18- Espressione di FPN1A/FPNTOT in macrofagi controllo, TM e TI.

L'isoforma 1A della ferroportina risulta molto espressa nei macrofagi controllo non trattati e poi diminuisce drasticamente se aggiungiamo DFO o FAC. I macrofagi TM e TI esprimono poca FPN1A e non si osservano variazioni tra i trattati e i non trattati.

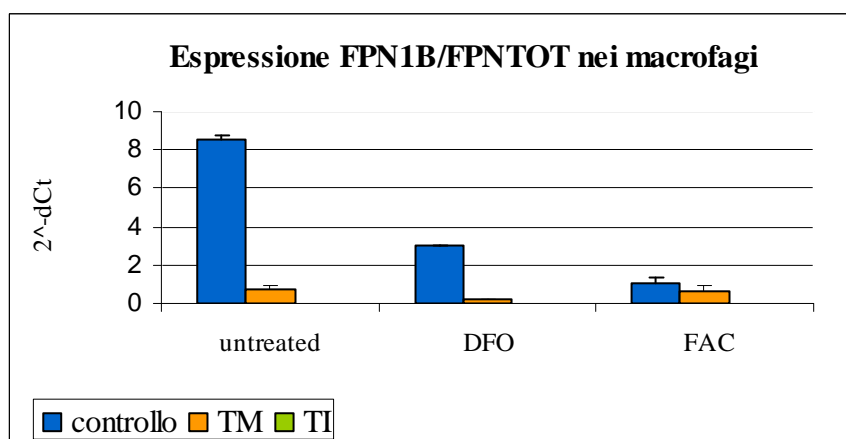


Grafico 19- Espressione di FPN1B/FPNTOT in macrofagi controllo, TM e TI.

L'isoforma FPN1B ha un'espressione paragonabile a quella della FPN1A: è molto espressa nei macrofagi controllo non trattati rispetto a quelli TM e TI dove l'isoforma risulta molto poco espressa. Se aggiungiamo DFO o FAC ai macrofagi controllo questi esprimono meno FPN1B rispetto al non trattato. Se aggiungiamo entrambi i composti ai macrofagi TM l'espressione della 1B è simile al non trattato e comunque molto bassa. I macrofagi TI anche se trattati con DFO o FAC non esprimono FPN1B.

❖ ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE DELLA TRANSFERRINA (TFR) IN CELLULE CD34 CONTROLLO, TM E TI

Al 7°, 11° e 14° giorno di coltura sono state raccolte $0,1 \times 10^6$ cellule controllo, TM e TI e analizzate al citofluorimetro. In particolare è stata studiata l'espressione del marcatore di membrana CD71, ovvero il recettore della transferrina. Il quantitativo di recettore (espresso come percentuale) presente sulla membrana cellulare è proporzionale al contenuto di ferro presente all'interno della cellula. Questo dato ci ha permesso di creare

correlazioni tra il tipo di cellula (controllo o talassemico) e la quantità di ferro intracellulare (Tabella 3).

	giorno 7		giorno 11		giorno 14	
	CAMPIONE	% CD71	CAMPIONE	% CD71	CAMPIONE	% CD71
CD34 CTRL	CTRL untreated	93	CTRL untreated	94	CTRL untreated	73,9
CD34 TM	TM untreated	94,7	TM untreated	96,6	TM untreated	90,9
CD34 TI	TI untreated	91	TI untreated	95	TI untreated	75

Tabella 3- Espressione percentuale del recettore della transferrina in cellule CD34.

La tabella descrive i valori percentuali del TfR in cellule CD34 controllo, TM e TI al 7°, 11° e 14° giorno di coltura. L'attenzione va all'espressione del recettore della transferrina durante il differenziamento eritroide in cellule controllo, TM e TI non trattate. Partendo dal controllo possiamo osservare come la percentuale del CD71 si mantiene alta nei primi stadi del differenziamento per poi diminuire drasticamente al 14° giorno. Il medesimo andamento coinvolge anche le cellule TI. Nel TM invece, l'espressione del recettore è per lo più costante durante tutto il differenziamento.

DISCUSSIONE

L'omeostasi del ferro negli esseri umani è mantenuta attraverso il preciso controllo di diversi fattori: l'assorbimento intestinale di ferro, il suo utilizzo per l'eritropoiesi, il riciclo dagli eritrociti senescenti e il deposito in epatociti e macrofagi. Tutti questi passaggi sono controllati in modo sistematico e coordinato. Le beta-talassemie sono anemie ereditarie dovute a difetti nella sintesi delle catene beta-globiniche e sono caratterizzate da eritropoiesi inefficace ed emolisi precoce. Le talassemie, ed in particolar modo le forme intermedie non-trasfusione dipendenti (TI) costituiscono un modello umano ideale per studiare il metabolismo del ferro in relazione all'eritropoiesi. La TI è caratterizzata da anemia e da una serie di complicanze, tra cui emopoiesi extra midollare, ulcere malleolari, calcoli biliari, stato di ipercoagulabilità e di ipertensione polmonare, che sono invece rare in pazienti con talassemia major (TM) in terapia trasfusionale. Le manifestazioni cliniche della TI sono il risultato di tre fattori chiave: eritropoiesi inefficace, anemia cronica e quindi diminuita produzione di globuli rossi e sovraccarico di ferro. A differenza dei pazienti con talassemia major (TM), nei quali il sovraccarico di ferro è dovuto soprattutto alla terapia trasfusionale, i pazienti con TI accumulano ferro principalmente a causa di un aumentato assorbimento intestinale e per l'eritropoiesi inefficace (135). Questo comporta un aumento di ferro nel plasma rilasciato dai tessuti e captato dalla transferrina, la quale viene saturata con la conseguente comparsa di ferro libero in eccesso. Ciò causa tossicità dovuta a danni tissutali provocati dai radicali liberi dell'ossigeno prodotti dal ferro. Per evitare tali danni i pazienti devono seguire una terapia ferro chelante per ridurre gli alti livelli di ferro. Ad oggi si sa molto poco sui meccanismi molecolari alla base del sovraccarico di ferro sia nei pazienti affetti da talassemia che in condizioni fisiologiche.

EPCIDINA Un ruolo chiave viene però attribuito all'interazione epcidina-ferroportina. L'epcidina, un piccolo peptide sintetizzato nel fegato, è un potente ormone in grado di controllare negativamente l'assorbimento intestinale di ferro e il rilascio dello stesso dai macrofagi verso la transferrina circolante attraverso la modificazione dell'espressione dell'esportatore cellulare di ferro, la ferroportina. In tal modo, l'epcidina controlla la disponibilità di ferro corporeo modulandone sia l'assorbimento intestinale sia la mobilizzazione dai macrofagi, agendo sull'efficienza di questi ultimi nel riciclo del ferro dai globuli rossi invecchiati (62,65). L'epcidina lega la ferroportina localizzata sulla membrana cellulare e ne determina la fosforilazione, internalizzazione e degradazione ubiquitina-mediata nei lisosomi (66); quest'ultima viene così eliminata dalla superficie della membrana plasmatica impedendo la fuoriuscita di ferro cellulare, ottenendo così come risultato finale un abbassamento della concentrazione plasmatica di ferro. Abbiamo dimostrato che in cellule al giorno 14 di coltura, quindi eritroblasti maturi, provenienti da individui con beta-talassemia intermedia, in cui coesistono un'intensa attività eritropoietica e sovraccarico di ferro, i livelli di epcidina sono bassi, al contrario i livelli di epcidina sono elevati in cellule di pazienti con beta-talassemia major in terapia cronica trasfusionale, che sopprime l'attività eritropoietica e contribuisce sostanzialmente al sovraccarico di ferro. I livelli di epcidina in cellule controllo provenienti da donatori sani si avvicinano a quelli delle cellule TI.

FERROPORTINA TOTALE Conseguentemente a quanto detto sopra abbiamo osservato una giusta correlazione epcidina-ferroportina totale: in cellule controllo e TI, essendo espressa poca epcidina alla fine del differenziamento eritroide (g14), abbiamo livelli più alti di ferroportina che favorisce la fuoriuscita del ferro dalle cellule. In cellule TM invece l'elevata espressione di epcidina al 14° giorno favorisce la degradazione della ferroportina che in effetti risulta poco espressa. Del resto, essendo le cellule TM povere di ferro

intracellulare non vi è la necessità di esprimere un trasportatore che lo porti all'esterno delle cellule. Infatti, la misurazione indiretta dei livelli di ferro intracellulare effettuata tramite quantificazione al citofluorimetro del recettore della transferrina (CD71) che è inversamente proporzionale al contenuto intracellulare di ferro, mostra alti livelli del marcatore sulle membrane delle cellule TM (90,9%) rispetto alle cellule controllo e TI i cui valori sono invece paragonabili (rispettivamente 73,9% e 75%). L'andamento generale della ferroportina totale (FPN1) evidenzia all'inizio del processo di differenziamento eritroide una sua maggiore espressione in cellule TI e TM contribuendo probabilmente al sovraccarico marziale tipico delle talassemie. Ad eritroblasti maturi invece, la ferroportina è principalmente espressa nelle cellule controllo perché oramai queste cellule non hanno più bisogno di ferro per l'eritropoiesi e preferiscono indirizzarlo ad altri distretti corporei che invece ne hanno un continuo bisogno, come il cuore e il cervello.

GDF15 Il segnale che comunica il livello di eritropoiesi al fegato affinché poi venga modulata l'espressione di epcidina è un'area di ricerca molto attiva. Recenti studi indicano che il fattore "Growth and Differentiation Factor 15" (GDF15), secreto dai precursori eritroidi, è in grado di inibire la produzione di epcidina in maniera tale da garantire l'aumento della disponibilità di ferro che viene veicolato al midollo osseo per permettere l'eritropoiesi, poiché questo ione è importante per la sintesi di emoglobina presente nei globuli rossi (59,81). Inibendo la sintesi di epcidina, il GDF15 permette l'espressione della ferroportina e quest'ultima agisce sulla membrana dell'enterocita garantendo il trasporto del ferro assorbito verso il circolo sanguigno; agisce anche sui tessuti deputati allo stoccaggio del ferro e sui macrofagi, in maniera tale da far fuoriuscire lo ione dalle cellule e condurlo al midollo. Il perché il GDF15 nei soggetti beta talassemici sia espresso maggiormente rispetto ai soggetti sani e le modalità secondo le quali esso regoli negativamente l'espressione di epcidina sono tutt'ora sconosciute. Altro gene candidato al ruolo di

regolatore dell'attività di epcidina è il fattore trascrizionale ipossia-inducibile (HIF), che controlla l'omeostasi del ferro coordinando la down regolazione di epcidina e la up regolazione dell'eritropoietina e della ferroportina (47). L'ipossia potrebbe anche down-regolare l'espressione di epcidina incrementando la produzione di emojuelina solubile (sHJV) e interferendo con il signaling delle Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) (88). Studiando l'espressione del GDF15 durante il differenziamento eritroide fisiologico a partire da cellule di donatori sani, abbiamo confermato quanto detto in letteratura, il GDF15 aumenta i propri livelli di espressione in parallelo con la maturazione degli eritroblasti, da ciò si evince che soprattutto negli ultimi giorni di crescita e differenziamento le cellule eritroidi necessitano della presenza della citochina. Ricordiamo infatti che il GDF15 è un membro della super famiglia del Trasforming Growth Factor beta (TGF- β) che è coinvolta in una serie di processi quali il differenziamento cellulare, lo sviluppo e l'apoptosi. A conferma di ciò la presenza nel promotore di GDF15 di siti di legame per p53 coinvolto proprio nel ciclo cellulare e l'apoptosi. Le stesse cellule controllo in condizioni di deplezione di ferro (ottenuta mediante l'aggiunta di deferoxamina, DFO) mostrano un'aumentata espressione di GDF15 al fine di favorire un aumento dell'assorbimento intestinale di ferro e quindi un riequilibrio delle concentrazioni dell'ione indispensabile per la cellula. Al contrario, in condizioni di ferro saturazione (ottenuta mediante l'aggiunta di ferro ammonio citrato, FAC), i livelli di GDF15 diminuiscono affinché si blocchi un ulteriore introito di ferro potenzialmente dannoso per la cellula. Esiste dunque una stretta dipendenza tra l'espressione e la produzione della citochina e le concentrazioni del ferro. Questi risultati sono importanti per capire come il GDF15 in condizioni fisiologiche intervenga effettivamente nella regolazione del metabolismo del ferro e di conseguenza come la modulazione delle concentrazioni di ferro possano modificarne l'espressione. Studiando invece l'espressione del GDF15 in colture

talassemiche intermedie (TI) e major (TM) durante il differenziamento eritroide, confermiamo quanto visto per le cellule controllo, ovvero la necessità del GDF15 per la crescita cellulare. Il GDF15 raggiunge infatti il picco di espressione sempre al 14° giorno di coltura. Un attento confronto al giorno 14 di coltura in cellule controllo, TI e TM, mostra come il GDF15 sia notevolmente elevato, sia come espressione molecolare sia come secrezione della proteina, nelle cellule TI rispetto alle cellule controllo e alle TM. Questo porterebbe a pensare in un primo momento che il GDF15 è altamente espresso in quadri patologici, in realtà questa ipotesi non è confermata dai livelli di GDF15 nella talassemia major. Sia come RNA che come proteina infatti, il GDF15 è meno espresso e successivamente poco secreto. Visto che entrambe le forme di talassemia sono caratterizzate da eritropoiesi inefficace ma solo la TI può essere presa come modello di questa alterazione in quanto i pazienti affetti da TM trasfondono, concludiamo che la discriminante che favorisce la considerevole presenza di GDF15 nel TI è proprio l'eritropoiesi inefficace. Ciò significa che a livello periferico i globuli rossi maturi sono scarsi, pertanto il midollo osseo continua ad incrementarne la produzione, richiedendo sempre più ferro necessario per la sintesi dell'eme, ma i proeritroblasti e gli eritrociti maturi hanno scarse possibilità di sopravvivenza a causa dell'alterazione delle loro catene globiniche che portano a stress cellulare, formazione di emicromi ossidanti, emolisi midollare e ad apoptosi periferica, scatenando in ultima analisi il rilascio di GDF15 (59). Questo comporta l'inibizione della sintesi di epcidina con conseguente aumento dell'azione della ferroportina che si rispecchia in un aumento di ferro nel paziente talassemico. Le colture di cellule TI sia in condizioni di deplezione che di saturazione di ferro esprimono poco GDF15 rispetto alle cellule non trattate, ciò fa pensare sicuramente ad un ruolo del GDF15 nell'eritropoiesi inefficace, ma anche ad una sua indipendenza dalle variazioni di concentrazioni del ferro. In aggiunta, il GDF15 potrebbe addirittura contribuire a generare

il sovraccarico marziale nella TI, o agendo direttamente sull'epcidina o interagendo con altri fattori quali HIF e sHJV a loro volta coinvolti nella regolazione negativa dell'epcidina. Le colture TM invece rispondono al ferro in modo del tutto opposto rispetto a quello che abbiamo visto accadere in condizioni fisiologiche: la ferro deplezione inibisce il GDF15, mentre la ferro saturazione lo stimola. Ciò potrebbe essere dovuto alle trasfusioni a cui vengono sottoposti i TM che causano un'azzeramento dell'attività midollare.

FERROPORTINA FPN1A e FPN1B Un adeguato apporto di ferro è importante per avere un'adeguata eritropoiesi, d'altra parte bisogna fare molta attenzione che il ferro non si accumuli negli eritroblasti durante il processo di maturazione, causando tossicità cellulare con conseguente apoptosi; per questo motivo è necessario che le cellule della linea eritropoietica siano dotate di un esportatore di ferro: la ferroportina (FPN1), l'unico ad oggi conosciuto. Attualmente si può affermare l'esistenza di due isoforme della ferroportina, quella IRE (iron responsive element) dipendente o FPN1A e quella non – IRE indipendente o FPN1B. Entrambe le isoforme 1A e 1B sono molto espresse negli enterociti ma l'isoforma 1B è prevalentemente espressa nella linea eritroide, dove rappresenta oltre il 60% dei livelli di mRNA della ferroportina (70,72). La nostra attenzione è stata dunque focalizzata sulle isoforme FPN1A e FPN1B per valutare qual è la differenza del loro profilo di espressione in cellule controllo, TI e TM e capire cosa influenza la presenza di una forma piuttosto che di un'altra. Durante il differenziamento eritroide fisiologico, l'espressione della FPN1A è alta negli stadi iniziali del differenziamento eritroide (giorno 0 di coltura) e nella fase finale (giorno 14 di coltura), suggerendo un ruolo funzionale a questi stadi. In particolare pensiamo che al 14° giorno, gli eritroblasti oramai maturi e quindi non più bisognosi di ferro per l'eritropoiesi, preferiscano indirizzarlo ad altri organi vitali come il cuore e il cervello. La down regolazione della FPN1A al giorno 7 di coltura,

quindi a metà del differenziamento eritroide, assicura la ritenzione del ferro all'interno degli eritroblasti, i quali ne necessitano in ampie quantità per garantire la produzione di eme e, di conseguenza, per permettere l'eritropoiesi. Simile alle cellule controllo è l'andamento della FPN1A nelle cellule TM, con l'unica differenza che quest'ultima rimane bassa anche al 14° giorno di coltura probabilmente perché gli eritroblasti TM, pur non potendo mai arrivare alla piena maturazione, cercano di assicurarsi una riserva di ferro potenzialmente utile. Al contrario l'espressione della FPN1A nelle cellule TI è invece molto alta al giorno 7 di coltura mentre si abbassa poi al 14° giorno e ciò potrebbe essere dovuto all'eritropoiesi inefficace e al ritardo del differenziamento delle cellule TI. L'andamento contrario contraddistingue l'espressione della FPN1B in cellule controllo: essa è infatti espressa solo al giorno 7 di coltura, ovvero durante il periodo critico quando le cellule sono indirizzate a proliferare e differenziare, questo perché, qualora l'organismo fosse in condizioni di carenza di ferro, deve poter evadere la repressione IRP/IRE (in gioco nell'isoforma FPN1A) ed esportare ferro dalle cellule eritroidi per garantire il flusso di ferro agli altri organi. Affinchè però ciò sia possibile risulta fondamentale avere un trasportatore che non risente dei livelli di ferro. Nelle cellule TI e TM l'isoforma FPN1B è molto espressa negli stadi precoci del differenziamento eritroide (giorno 0 di coltura) contribuendo probabilmente al sovraccarico di ferro in entrambe le forme di talassemia. La persistente alta espressione della FPN1B in cellule TI anche al 14° giorno di coltura rispetto a quelle controllo e TM è probabilmente dovuto all'attività eritropoietica per eccesso di eme non incorporato in globine. In ultima analisi quindi, altri segnali, come lo stato dell'attività eritropoietica, possono superare il sovraccarico di ferro nella regolazione dell'espressione della ferroportina. Trattare cellule controllo con un chelante del ferro o con del ferro non introduce significative modifiche nell'espressione né della isoforma 1A né della 1B pur contenendo una sequenza responsiva al ferro. Le cellule TM in condizioni

di ferro deplezione aumentano l'espressione della FPN1A in quanto il chelante, sottraendo il ferro extracellulare, crea uno squilibrio dello ione e la cellula esprime FPN1A affinché lo esporti all'esterno. Le cellule TI invece, a contatto con DFO, diminuiscono l'espressione della FPN1A perché il chelante va a togliere direttamente il ferro intracellulare e quindi la cellula privata di ferro non ne ha da esportare e per questo non esprime il trasportatore. L'aggiunta di FAC invece non induce modifiche né in cellule TI, né in cellule TM. L'isoforma FPN1B è maggiormente espressa sia in cellule TI che TM trattate con DFO rispetto alle cellule non trattate, in quanto la diminuzione di ferro causata dal chelante, potrebbe aumentare l'eritropoiesi inefficace in modo forte e maggiore nel TI ma in parte anche nel TM nonostante le trasfusioni e siccome la 1B abbiamo visto essere legata proprio all'eritropoiesi inefficace, questa non può che aumentare. Questi ultimi dati avvalorano la tesi per cui l'eritropoiesi inefficace può essere considerata il principale segnale che determina le modificazioni di espressione dei principali geni coinvolti nel metabolismo del ferro come appunto la ferroportina e il già citato GDF15.

MACROFAGI La produzione di nuovi eritrociti nel midollo osseo è un processo che richiede l'utilizzo di ferro depositato nel corpo e l'attività eritroide del midollo controlla l'omeostasi del ferro. I macrofagi giocano un ruolo importante nel controllare la biodisponibilità di ferro per l'eritropoiesi. Queste cellule che fagocitano i globuli rossi senescenti, riciclano circa 20-25 mg di ferro eme, quantità necessaria per la produzione giornaliera di nuovi eritrociti (73). Il legame tra i vecchi globuli rossi con la membrana dei macrofagi porta alla formazione di vescicole fagocitiche che internalizzano gli eritrociti così da poterli degradare. Le molecole di eme rilasciate nel citosol fungono da sensore molecolare per la trascrizione di eme ossigenasi (HO-1) che degrada l'eme, rilascia CO, biliverdina e ferro ferroso (Fe II). A questo punto il ferro liberato può essere sturato con le molecole di ferritina e utilizzato in un secondo momento o esportato fuori dal plasma

tramite la ferroportina. In virtù di quest'ultima funzione abbiamo infatti osservato come in cellule controllo non trattate l'espressione di entrambe le isoforme della ferroportina FPN1A e FPN1B è alta. Condizioni di ferro saturazione o ferro deplezione, invece, down regolano fortemente l'espressione di entrambe le isoforme, facendo ipotizzare la presenza di un altro sistema di regolazione oltre a quello post-trascrizionale da parte del ferro. A livello post-trascrizionale infatti, le modificazioni del contenuto di ferro intracellulare sono normalmente rilevate da proteine regolatrici del ferro, IRP1 e IRP2 che, agendo da sensori delle quantità di ferro, regolano la trascrizione della ferroportina attraverso il legame con degli elementi responsivi al ferro (IREs) presenti nelle regioni non codificanti dell'mRNA di questo gene. In questo caso invece, non avendo trovato una stretta correlazione tra concentrazioni di ferro e ferroportina, ipotizziamo che la gestione del ferro nei macrofagi possa dipendere da un'altra regolazione. Ad avvalorare questa ipotesi c'è la teoria di alcuni ricercatori per cui esisterebbe un'ulteriore regolazione, che tra l'altro sembra valere anche per la ferroportina espressa nelle cellule eritroidi, ovvero una regolazione trascrizionale da parte dell'eme. Infatti il processo di eritrofagocitosi attraverso il pathway mediato dall'eme, induce la sintesi di FPN, HO-1 e ferritina. In condizioni di abbondante eme, questo lega il repressore trascrizionale Bach1 che normalmente forma un eterodimero con una proteina chiamata MafK. Quest'ultima non complessata a Bach1 può così legare un elemento di reclutamento Maf (Maf Recognition Element MARE) presente su alcuni geni target inducendone la trascrizione (75). L'eme, in forma di emina o come emoglobina, attiva in particolare la sintesi di FPN in modo ferro-indipendente (76). In cellule TI e TM la ferroportina non è espressa e ciò potrebbe essere dovuto al fatto che i macrofagi TI e TM risentendo del sovraccarico extracellulare di ferro reprimono l'espressione di FPN affinché non venga esportato ulteriore ferro potenzialmente tossico. Per quanto riguarda l'espressione del GDF15 nei macrofagi controllo abbiamo visto come l'andamento è lo

stesso di quello osservato nelle CD34⁺: condizioni di ferro deplezione ne incrementano sia l'espressione che la secrezione, mentre condizioni di ferro saturazione diminuiscono la presenza sia come RNA che come proteina del GDF15. Infatti aumentati livelli di GDF15 causano un aumento dell'efflusso di ferro dai macrofagi, contribuendo così ad incrementare la saturazione della transferrina e a rendere quindi disponibile ferro nei tessuti. Diminuiti livelli di GDF15 invece, incrementano l'attività del macrofagi e contribuiscono a trattenere ferro nei macrofagi per limitare un ulteriore accumulo di ferro potenzialmente dannoso per i tessuti. I macrofagi TI si comportano nello stesso modo dei macrofagi controllo ma in modo diverso rispetto alle CD34 TI: se infatti in quest'ultime la presenza di GDF15 era indipendente alle concentrazioni di ferro e probabilmente ciò era dovuto all'eritropoiesi inefficace, nei macrofagi la regolazione del GDF15 è nuovamente affidata ai livelli di ferro, aumentando in condizioni di ferro deplezione e diminuendo in condizioni di ferro saturazione. Dunque nel TI sembrano esistere due diversi sistemi di regolazione del GDF15 a seconda del tipo di cellula coinvolta: infatti nelle CD34 mutate esiste una regolazione insensibile alle variazioni di ferro e invece fortemente influenzata dall'eritropoiesi inefficace mentre nei macrofagi non mutati esiste una regolazione ferro-dipendente, proprio come nei controlli sani. I macrofagi TM trattati con ferro e chelante rispondono in modo simile ai non trattati, quasi fossero spenti. Ciò potrebbe essere dovuto alle trasfusioni a cui vengono sottoposti i TM che causano un'azzeramento dell'attività midollare.

CONCLUSIONE Sebbene nel corso degli ultimi anni le conoscenze circa i meccanismi molecolari che regolano il metabolismo del ferro siano notevolmente migliorate attraverso la comprensione delle basi genetiche dell'emocromatosi e la scoperta dell'epcidina, ad oggi non sono ancora chiari i meccanismi di regolazione del metabolismo del ferro in condizioni sia fisiologiche che patologiche. Il progetto di dottorato ha avuto l'obiettivo di

ampliare le conoscenze in merito al GDF15, alla ferroportina e alle sue isoforme, ricercando potenziali regolatori e cause delle loro alterazioni. Abbiamo inoltre cercato di comprendere le diverse connessioni cliniche e molecolari che differenziano una talassemia major da una intermedia e a loro volta da un normale, indirizzandoci anche verso altri importanti tipi cellulari coinvolti nel metabolismo del ferro. Chiarire ulteriormente i meccanismi di regolazione dell'omeostasi del ferro potrebbe avere importanti implicazioni per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sulla manipolazione della sintesi di epcidina per la cura di condizioni cliniche sia genetiche che acquisite caratterizzate da alterato metabolismo del ferro.

BIBLIOGRAFIA

1. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. "Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism". *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:940–959.
2. Andrews NC. "Disorders of iron metabolism". *N Engl J Med* 1999:1986– 1995.
3. Laufberger V. "Sur la cristallisation de la ferritine". *Soc Chim Biol.* 1937;19:1575-1582.
4. Schade AL, Caroline L. "An iron-binding component in human blood plasma". *Science.* 1946;104:340-341.
5. Andrews NC. "A genetic view of iron homeostasis". *Semin Hematol* 2002;39:227-34. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:309-314.
6. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. "An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron". *Science.* 2001;291:1755-1759.
7. Hubert N, Hentze MW. "Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function". *Proc Natl. Acad Sci USA.* 2002;99:12345-12350.
8. Lam-Yuk-Tseung S, Touret N, Grinstein S, Gros P. "Carboxyl-terminus determinants of the iron transporter DMT1/SLC11A2 isoform II (-IRE/1B) mediate internalization from the plasma membrane into recycling endosomes". *Biochemistry.* 2005;44:12149-12159.
9. Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P. "Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron". *Blood.* 1999;93:4406-4417.

10. Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC. “Nramp2 is utated in the anemic Belgrade 11.(b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport”. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:1148-1153.
11. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. “Cloning and characterization of a mammalian protoncoupled metal-ion transporter”. *Nature*. 1997;388:482-488.
12. Gunshin H, Fujiwara Y, Custodio AO, Drenzo C, Robine S, Andrews NC. “Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver”. *J Clin Invest*. 2005;115:1258-1266.
13. Oudit GY, Sun H, Trivieri MG, et al. «L-type Ca(2⁻) channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy”. *Nat Med*. 2003;9:1187-1194.
14. Lee PL, Gelbart T, West C, Halloran C, Beutler E. “The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms”. *Blood Cells Mol Dis* 1998;24:199-215.
15. Lam-Yuk-Tseung S, Gros P. “Distinct targeting and recycling properties of two isoforms of the iron transporter DMT1 (NRAMP2, Slc11A2)”. *Biochemistry* 2006;45:2294-2301.
16. Trinder D, Oates PS, Thomas C, Sadleir J, Morgan EH. “Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload”. *Gut* 2000;46:270-276.
17. Mims MP, Guan Y, Pospisilova D, Priwitzerova M, Indrak K, Ponka P, et al. “Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload”. *Blood* 2005; 105:1337-1342.
18. Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. “Function and regulation of transferrin and ferritin”. *Semin Hematol* 1998;35:35– 54.

19. Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, et al. "Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system". *Nat Genet* 1999;21:396-9.
20. Kawabata H, Yang R, Hiramata T et al. « Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family". *J Biol Chem* 1999;274:20826–20832.
21. Camaschella C, Roetto A, Cali A et al. "The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22". *Nat Genet* 2000;25:14–15.
22. Sacher A, Cohen A, Nelson N. "Properties of the mammalian and yeast metal-ion transporters DCT1 and Smf1p expressed in *Xenopus laevis* oocytes". *J Exp Biol.* 2001;204:1053-1061.
23. Shaw GC, Cope JJ, Li L, et al. "Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation". *Nature.* 2006;440:96-100.
24. Quigley JG, Yang Z, Worthington MT, et al. "Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis". *Cell.* 2004;118:757-766.
25. Keel SB, Doty RT, Yang Z, et al. "Heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis". *Science.* 2008;319:825-828.
26. Harrison PM, Arosio P. "The ferritin: molecular properties, iron storage function and cellular regulation". *Biochim Biophys Act* 1996;1275:161-203.
27. Frazer DM, Anderson GJ. "The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues?". *Blood Cells Mol Dis* 2003; 30:288-97.
28. Roy CN, Enns CA. "Iron homeostasis: new tales from the crypt". *Blood* 2000; 96: 4020–4027.
29. Rouault T. "Post-transcriptional regulation of human iron metabolism by iron regulatory proteins". *Blood Cell Mol Dis.* 2002;29(3):309-14.

30. Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Rouault TA. "Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo". *Science*. 2004;306:2087-2090.
31. Grabill C, Silva AC, Smith SS, et al. "MRI detection of ferritin iron overload and associated neuronal pathology in iron regulatory protein-2 knockout mice". *Brain Res* 2003;971:95-106.
32. Ganz T. "Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation". *Blood* 2003;102:783-8.
33. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T & Vogel HJ. "The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis". *J Biol Chem* 2002; 277: 37597–37603.
34. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. "Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver". *J Biol Chem* 2001; 276: 7806–7810.
35. Wallace DF, Summerville L, Lusby PE, Subramaniam VN. "Prohepcidin localises to the Golgi compartment and secretory pathway in hepatocytes". *J Hepatol* 2005;43:720-728.
36. Detivaud L, Nemeth E, Boudjema K, Turlin B, Troadec MB, Leroyer P, et al. "Hepcidin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function". *Blood* 2005;106:746-748.
37. Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al. "LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity". *FEBS Lett* 2000;480:147–150.
38. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. « A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload". *J Biol Chem* 2001;276:7811–7819.

39. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, et al. “Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice”. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8780–8785.
40. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al. “Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis”. *Nat Genet* 2003; 33: 21–22.
41. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, et al. “Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin”. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4596–4601.
42. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. “The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation”. *J Clin Invest.* 2002;110:1037-1044.
43. Adamsky K, Weizer O, Amariglio N, et al. “Decreased hepcidin mRNA expression in thalassemic mice”. *Br J Haematol.* 2004;124:123-124.
44. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. “A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload”. *J Biol Chem.* 2001;276:7811-7819.
45. Wrighting DM, Andrews NC. “Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3”. *Blood.* 2006; 108:3204-3209.
46. Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, Stolte J, HentzeMW, Muckenthaler MU. “STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation”. *Blood.* 2007;109:353-358.
47. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, et al. “Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs)”. *J Clin Invest.* 2007;117:1926-1932.

48. Courselaud B, Pigeon C, Inoue Y, et al. "C/EBPalpha regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism: cross-talk between C/EBP pathway and iron metabolism". *J Biol Chem.* 2002;277:41163-41170.
49. Weizer-Stern O, Adamsky K, Margalit O, et al. "Hepcidin, a key regulator of iron metabolism, is transcriptionally activated by p53". *Br J Haematol.* 2007;138:253-262.
50. Wang RH, Li C, Xu X, et al. "A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression". *Cell Metab.* 2005;2:399-409.
51. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, et al. "Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression". *Nat Genet.* 2006;38:531-539.
52. Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E. "Different regulatory elements are required for response of hepcidin to interleukin-6 and bone morphogenetic proteins 4 and 9". *Br J Haematol.* 2007;139:138-147.
53. Nicolas G, Viatte L, Lou DQ, et al. "Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis". *Nat Genet* 2003;34:97-101.
54. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, et al. "The transferrin receptor modulates hfe-dependent regulation of hepcidin expression". *Cell Metab* 2008;7:205-214.
55. Xia Y, Babitt JL, Sidis Y, Chung RT, Lin HY. "Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin". *Blood* 2008;111:5195-204.
56. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, et al. "Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression". *Nat Genet* 2006; 38:531-9.
57. Lin L, Goldberg YP, Ganz T. "Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin". *Blood* 2005;106: 2884-9.

58. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. "IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin". *J Clin Invest* 2004;113:1271-1276.
59. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, et al. "High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin". *Nat Med* 2007; 13:1096-1101.
60. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, et al. "A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation". *Mol Cell*. 2000 Feb;5(2):299-309.
61. Haile DJ. "Assignment of Slc11a3 to mouse chromosome 1 band 1B and SLC11A3 to human chromosome 2q32 by in situ hybridization". *Cytogenet Cell Genet*. 2000;88(3-4):328-9. No abstract available.
62. Nemeth E, et al. "Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization". *Science* 2004;306(5704):2090-3.
63. Rouault TA. "The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease". *Nat Chem Biol*. 2006 Aug;2(8):406-14.
64. Lymboussaki A, Pignatti E, Montosi G, Garuti C, Haile DJ, Pietrangelo A. "The role of the iron responsive element in the control of ferroportin1/IREG1/MTP1 gene expression". *J Hepatol*. 2003 Nov;39(5):710-5.
65. Mark D, Fleming " The regulation of hepcidin and its effect on systemic and cellular iron metabolism". *Hematology* 2008.
66. Mackenzie EL, Iwasaki K and Tsuji Y. "Intracellular Iron Transport and Storage: From Molecular Mechanisms to Health implications". *Antioxidant & Redox Signaling*. Volume 10, Number 6, 2008.
67. Nemeth E, Ganz T. "Regulation of iron metabolism by hepcidin". *Annual Reviews Nutritional* 2006.

68. Darshan D, Anderson GJ. "Liver-gut axis in the regulation of iron homeostasis". *World J Gastroenterol*. 2007 Sep 21;13(35):4737-45. Review.
69. Wrighting DM, Andrews NC. "Iron homeostasis and erythropoiesis". *Curr Top Dev Biol*. 2008;82:141-67.
70. Zhang DL, Hughes R, et al. "A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translation repression". *Cell Metab*. 2009.
71. Cianetti L, Gabbianelli M, Maria Sposi N. "Ferroportin and erythroid cells : an update". Hindawi publishing corporation, *advance in hematology*. Vol 2010.
72. Zhang DL, Seneca T, Ghosh MC, et al. "Hepcidin regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts". *American society of hematology*, 2011.
73. Beaumont C, Delaby C. "Recycling iron in normal and pathological states". *Semin Hematol*. 2009; 46(4): 328-38.
74. De Domenico I, Vaughn MB, et al. "Cell-autonomous and systemic context-dependent functions of iron regulatory protein 2 in mammalian iron metabolism". *Blood*. 2009; 113(3): 679-87.
75. Marro S, Chiabrando D, et al. "Heme controls ferroportin1 transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif position-7007 of the FPN1 promoter". *Haematologica* 2010(8): 1261-8.
76. Beaumont C. "Multiple regulatory mechanisms act in concert to control ferroportin expression and heme iron recycling by macrophages". *Haematologica* 2010.
77. Pietrangelo A. "The ferroportin disease". *Blood Cells Mol Dis*. 2004; 32(1): 131-8.
78. Weiss G. "Iron metabolism in the anemia of chronic disease". *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790(7): 682-93.

79. Nemeth E, Ganz T. "Regulation of iron metabolism by hepcidin". Annual Reviews Nutritional 2006.
80. Darshan D, Anderson GJ. "Interacting signal in the control of hepcidin expression". Biometals 2009.
81. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, et al. "High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin". Nature medicine 2007.
82. Casanovas G, Swinkels WD, Altamura S, et al. "Growth differentiation factor 15 in patient with congenital dyerythropoietic anaemia (CDA) type II". Springer 2011.
83. Motonobu O, Hannah LP, Min JP, Jun-Wei L, Guojun W, Barry T, David S. "A p53-type response element in the GDF15 promoter confers high specificity for p53 activation". Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007.
84. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, and Lin HY. "Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance". The journal of clinical investigation, volume 117, 2007.
85. Andriopoulos B, Corradini E, Xia Y, Fasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, Pietrangelo A, Vukicevic S, Lin HY and Babitt JL. "BMP-6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism". Nature genetics, volume 41, 2009.
86. Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP. "Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload". Nature genetics, volume 41, 2009.
87. Camaschella C and Silvestri L. "New and old players in the hepcidin pathway". Haematologica 2008.
88. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. "Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis". Blood, volume 111, 2008.

89. Lee PL, Beutler E. "Regulation of hepcidin and iron-overload disease". Annual Reviews of pathology: Mechanisms of Disease. 2009.
90. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. "The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin". Cell metabolism 2008.
91. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. "A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis". Nat Genet 1996;13:399-408.
92. Roetto A, Totaro A, Cazzola M, et al. "The juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q". Am J Hum Genet 1999;64:1388-93.
93. Powell LW, Jazwinska E, Halliday JW. "Primary iron overload".
94. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, et al. "Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis". Nat Genet 2003, DOI 10.1038/ng1274.
95. Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, et al. "A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis". Nat Genet 2001; 28:213-4.
96. Smchmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. "The transferrin receptor modulates HFE-dependent regulation of Hepcidin expression". Cell metabolism 7, 205-214, 2008.
97. Casanovas G, Swinkels DW, Altamura S, et al. "Growth differentiation factor 15 in patient with congenital dyerythropoietic anaemia (CDA) type II". Springer 2011.
98. "The thalasseмии", in STAMATOYANNOPOULOS G., NEINHUIS AW, MAJERUS PW, VARMUS H. "The molecular basis of blood diseases", Philadelphia, p.183, 2001.
99. Weatherall DJ. "Hemoglobinopathies worldwide: present and future". Curr Mol Med 8, 592-599, 2008.

100. Castoldi GL, Cuneo A. "Anemie", in CASTOLDI G., LISO V.: *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici*, McGraw-Hill, p. 86, 2007.
101. Cappellini MD. "Anemie", in CORRADINI P, FOA' R: *Manuale di Ematologia*, p.39, 2008.
102. Wood B, Higgs D. "Molecular basis of thalassemia syndromes", in ESH- *Disorders of erythropoiesis, erythrocytes and iron metabolism*, p. 250, 2009.
103. Weatherall DJ. "The thalassemia syndromes". Fourth Edition, Blackwell Science, 2001.
104. Ginzburg Y, Rivella S. " β -thalassemia: a model for elucidating the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism". *Blood* 2011.
105. Cappellini MD, Taher A, "Thalassemia intermedia", in ESH- *Disorders of erythropoiesis, erythrocytes and iron metabolism*, p. 286, 2009.
106. Roselli E, Mezzadra R, Markt S, Ferrari G. "Correction of β -thalassemia major by gene transfer in haematopoietic progenitors of pediatric patients". *EMBO Molecular Medicine* 2, 315-328, 2010.
107. Camaschella C, Cappellini MD. "Thalassemia Intermedia". *Haematologica*, 1995.
108. Taher A., Cappellini MD. "Iron overload in Thalassemia Intermedia: reassessment of treatment strategies". *British journal of Haematology*, 2009.
109. Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A, Lee YT, Goodnough JB, Harandi O, Ganz T, Paulson RF and Miller JL. "Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells". *Blood*, July 2009.
110. Gunsilius E, Gastl G, Petzer A.L. "Hematopoietic stem cells". *Biomed pharmacother* 55, 186-194, 2001.

111. Papayannopoulou T, Lemischka I. “*Stem cell biology*” in Stamatoyannopoulos G., Neinhuis AW., Majerus PW., Varmus H.: “The molecular basis of blood diseases”. Philadelphia, p.1, 2001.
112. Wieczorek AJ, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. “Autocrine / paracrine mechanisms in human hematopoiesis”. *Stem cells* 19, 99-107, 2001.
113. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, Stradford MW. “CD34: structure, biology and clinical utility”. *Blood* 87 (1), 1-13, 1996.
114. Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ. “New insights into erythropoiesis”. *Current opinion in hematology* 9, 93-100, 2002.
115. Motoyama N, Kimura T, Takahashi T. “Bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation”. *Journal of experimental medicine* 189, 1691-1698, 1999.
116. Kaushansky K. “Hematopoietic growth factors and receptors”, in Stamatoyannopoulos G, Neinhuis AW, Majerus PW, Varmus H. *The molecular basis of blood diseases*, Philadelphia, p.25, 2001.
117. Ratajczak J, Majka M, Kijowski J, Baj M, Pan Z, Marquez LA, Janowska- Wieczorek A, Ratajczak MZ. “Biological significance of MAPK, AKT and JAK-STAT protein activation by various erythropoietic factors in normal human early erythroid cells”. *British journal of haematology* 115, 195-204, 2001.
118. Stopka T, Zivny JH, Stopkova P, Prchal JF, Prchal JT. “Human hematopoietic progenitors express erythropoietin”. *Blood* 91 (10), 3766-3772, 1998.
119. Orkin SH, Weiss M. “Cutting red-cell production”. *Nature* 401, 433-436, 1999.
120. Orkin SH. “Transcription factors that regulate lineage decisions”, in Stamatoyannopoulos G., Neinhuis AW., Majerus PW., Varmus H.: *The molecular basis of blood diseases*, Philadelphia, p.80, 2001.

121. Celedon G, Rodriguez I, Espana J. "Contribution of hemoglobin and membrane constituents modification to human erythrocyte damage promoted by peroxy radicals of different charge and hydrophobicity". *Free Radic Res*, 34, 17-31, 2001.
122. Mannu F, Arese P, Cappellini MD, Fiorelli G, Cappadoro M, Giribaldi G, Turrini F. "Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in β -thalassemia intermedia erythrocytes". *Blood*, 86, 2014-2020, 1995.
123. Rachmilewitz EA, Lubin BH, Shohet SB. "Lipid membrane peroxidation in β -thalassemia major". *Blood*, 47, 495-505, 1976.
124. Zhou D, Kaimao L, Townes TM. "KLF1 regulates BCL11A expression and γ - to β -globin gene switching". *Nature Genetics* 1-3, 2010.
125. Cantor AB, Oorikin SH. "Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners". *Oncogene*, 21, 3368-3376, 2002.
126. Cantù C, Ronchi A. "A highly conserved SOX6 double binding site mediates SOX6 gene downregulation in erythroid cells". *NAR* 1-16, 2010.
127. Xu J, Sankaran VG, Orkin SH. "Transcriptional silencing of gamma globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6". *Genes Dev.* 24, 783-798, 2010q.
128. Sankaran VG, Xy J, Orkin SH. "Transcriptional silencing of fetal hemoglobin by BCL11A". *Ann N Y Acad Sci* 1202, 64-68, 2010.
129. Sankaran VG, Menne TF, Oorikin SH. "Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A". *Science* 32, 1839-1842, 2008.
130. Jawaid K, Wahlberg K, Thein SL, Best S. "Binding patterns of BCL11A in the globin and GATA1 loci and characterization of the BCL11A fetal hemoglobin locus". *Blood Cells, Molecules and Diseases* 45, 140-146, 2010.

131. Stamatoyannopoulos G, Grosveld F. "Hemoglobin switching", in Stamatoyannopoulos G, Neinhuis AW, Majerus PW, Varmus H. The molecular basis of blood diseases, Philadelphia, p.135, 2001.
132. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. "Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications". Hum Mol Gen 18, 216-223, 2009.
133. Bauer DE, Orkin SH. "Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies". Current Opinion in Pediatrics 23, 1-8, 2011.
134. Ronzoni L, Bonara P, Cappellini M.D. "Erythroid differentiation and maturation from peripheral CD34⁺ cells in liquid culture: cellular and molecular characterization". Blood Cells Mol Dis 40(2), 148-155, 2008.