



Effetti della sovraespressione di ferritina mitocondriale in precursori eritroidi normali

Serena Marra¹, Agnese Filocco¹, Erica Travaglino², Anna Galli², Rosangela Invernizzi¹,
Matteo Della Porta², Carmela Marseglia², Luca Malcovati²,
Vittorio Rosti³, Gaetano Bergamaschi⁴

¹Clinica Medica III, ²Clinica Ematologica, ³Laboratorio di Epidemiologia Clinica, e ⁴Clinica Medica I,
Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Effetti della sovraespressione di ferritina mitocondriale in precursori eritroidi normali

La ferritina mitocondriale (FtMt) è una isoforma ferritinica omopolimerica a localizzazione caratteristicamente mitocondriale. Nell'uomo è espressa a livello del sistema nervoso, miocardico, renale, testicolare, ossia tessuti ad elevato consumo di energia, ma anche nei sideroblasti ad anello in corso di anemia sideroblastica. Il principale ruolo funzionale della FtMt è di agire come antiossidante; infatti mitocondri sono i principali produttori di ROS, perciò il ferro mitocondriale deve essere regolato per ridurre la reazione di Fenton, generata dalla vicinanza tra ossigeno e metalli alcalini.

Nelle anemie sideroblastiche, gruppo di rari disordini ematologici caratterizzati da una alterata biosintesi dell'eme e presenza di sideroblasti ad anello in percentuale >15% a livello del midollo osseo emopoietico, i granuli perinucleari Perls positivi dei sideroblasti sono costituiti da depositi cristallini di ferro localizzati a livello dello creste mitocondriali. Studi precedenti hanno già dimostrato che nelle anemie refrattarie sia congenite che acquisite il ferro depositato nei mitocondri perinucleari dei sideroblasti ad anello è legato alla ferritina mitocondriale. Inoltre è noto che nelle anemie sideroblastiche acquisite l'aberrante espressione di ferritina mitocondriale avviene molto precocemente durante la differenziazione eritroide e che l'espressione di ferritina mitocondriale si correla a rilascio di citocromo c, con attivazione delle vie apoptotiche. Dal momento che è evidente l'importante ruolo rivestito dalla ferritina mitocondriale nella patogenesi dell'eritropoiesi inefficace delle anemie refrattarie con sideroblasti ad anello, ma non se ne conoscono i meccanismi, riveste un sicuro interesse l'utilizzo di modelli cellulari basati su colture di progenitori emopoietici trasdotti con lentivirus allo scopo di chiarire gli effetti funzionali e i meccanismi molecolari con cui l'espressione di FtMt induce la prematura morte cellulare. Il protocollo di trasduzione lentivirale è stato messo in atto su elementi midollari immaturi CD34+ isolati dalle cellule mononucleate di 8 donatori normali. Le cellule CD34 positive sono state coltivate per 14-21 giorni in Iscove Medium in presenza di fattori di crescita, in modo da indurre una differenziazione in senso eritroide. Sono stati poi allestiti dei citocentrifugati sui quali abbiamo eseguito opportune reazioni immunocitochimiche.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che la sovraespressione di FtMt era in grado di ridurre il contenuto citosolico di ferritina H e aumentare l'espressione di CD71 (quindi l'*uptake* di ferro), realizzando un quadro compatibile con una condizione di deplezione di ferro citosolico e interferendo con l'attività proliferativa. Lo ione si accumulerebbe quindi nei mitocondri, causando la formazione dei sideroblasti ad anello. Abbiamo dunque ipotizzato che la sovraespressione di FtMt potrebbe, modificando la disponibilità di ferro mitocondriale e danneggiando il mitocondrio, indurre apoptosi e dunque condurre a una condizione di eritropoiesi inefficace. In effetti il fenotipo da noi osservato nei progenitori normali trasdotti è risultato simile a quello dei progenitori eritroidi di pazienti con anemia sideroblastica.

Effects of the mitochondrial ferritin overexpression in normal erythroid precursors

Mitochondrial ferritin (FtMt) is a homopolymeric ferritinic isoform, typically localized in mitochondria. In men it is expressed in nervous, myocardial, renal, testicular tissues, that are tissues with high energy use. However it is even overexpressed in ring sideroblasts in patients affected by sideroblastic anemia. The main functional role of MtFt is to act as antioxidant; in fact mitochondria are the most important producer of ROS and so mitochondrial iron must be controlled to reduced Fenton's reaction, which is generated by oxygen and alkalyne metals.

Sideroblastic anemias are a group of rare hematological disorders characterized by an anomalous biosynthesis of Heme and a percentage of ring sideroblasts >15% in bone marrow; the perinuclear, Perls positive, granules of ring sideroblasts are made of crystalline deposits of iron, which are localized on mitochondrial *crista*. Previous studies have demonstrated that, in both congenital and acquired sideroblastic anemias, iron of Perls positive granules is joined to FtMt. Moreover it was interestingly noticed that in acquired sideroblastic anemias the aberrant expression of FtMt it appeared very prematurely during erythroid differentiation and that overexpression of FtMt is related to cytochrome c release and activation of apoptotic way. Since it is clear the important role played by FtMt in pathogenesis of sideroblastic anemias, but the mechanisms are unknown, so is very important to use cellular models based on cultures made of hemopoietic precursors, which are trasduced by lentiviral vectors.

The lentiviral transduction protocol was put in place on medullar immature cells CD34+, isolated from mononuclear cells of 8 normal donors. The CD34+ cells were grown for 14-21 days in Iscove Medium in the presence of grow factors; in this way we induced erythroid differentiation. Then we made some cytopins to realize opportune immunocytochemical reactions. The results have shown that the overexpression of mitochondrial ferritin can reduced the cytosolic contents of H ferritin and it increased the expression of CD71 and iron's uptake; in this way it realizes a picture which is compatible with cytosolic iron depletion and it interferes with proliferation activity. We propose that FtMt overexpression, modifying the availability of iron, induces apoptosis and conduces to ineffective erythropoiesis. In fact, the phenotype we observed in normal transduced progenitors was very similar to that of erythroid progenitors of patients with sideroblastic anemia.

Introduzione

La ferritina mitocondriale (FtMt) è un'isoforma di ferritina omopolimerica a localizzazione mitocondriale descritta nell'uomo, nel topo, nella *Drosophila* e nelle piante (Figura 1) [1-2], che si differenzia per molti aspetti dall' isoforma citoplasmatica. La ferritina mitocondriale è stata originariamente identificata come un ortologo del gene FTH1 che codifica per la ferritina citosolica H [3]. Il gene della MtFt umano è codificato da una sequenza priva di introni, localizzata sul cromosoma 5, precisamente 5q23.1 e ha le caratteristiche tipiche degli pseudogeni (Figura 2). Il prodotto genico, viene sintetizzato come precursore di circa 30 kD che, grazie a una sequenza leader di 60 AA, viene trasportato nei mitocondri e qui processato in una subunità di 22 kD. Dopo essere stato processato ha un 80% di sovrapposibilità con la catena H della ferritina citosolica e un 55% con la catena L[2]. Nell'uomo alti livelli, oltre che nei sideroblasti ad anello dei pazienti con anemia sideroblastica, sono stati individuati a livello testicolare, renale, nervoso e miocardico. L'isoforma non è invece stata identificata a livello epatico e splenico, che sono gli organi maggiormente deputati all'accumulo marziale. Tale espressione caratterizza quindi tipi cellulari con metabolismi altamente attivi, che richiedono molta energia per la moti-

lità e per il processo di assorbimento/fagocitosi. Sulla base di questi risultati l'espressione della FtMt sembrerebbe essere correlata alla necessità di alcune cellule di utilizzare l'ATP in un breve intervallo di tempo e, poiché questa particolare richiesta d'energia è associata alla produzione di specie reattive dell'ossigeno che derivano da reazioni di tipo Fenton, l'espressione della proteina potrebbe essere un tentativo di difesa della cellula al danno ossidativo [2]. Corsi *et al.* hanno dimostrato, su cellule trasfettate con DNA codificante per la FtMt, che questa regola la disponibilità dello ione e protegge la cellula dalle specie reattive dell'ossigeno, esercitando un'affinità per il metallo nettamente superiore rispetto alle forme citosoliche, tanto che la sua over-espressione causa un fenotipo cellulare sideropenico [4]. Di conseguenza alti livelli di ferritina mitocondriale comportano una redistribuzione del ferro dal citoplasma al mitocondrio, con conseguente carenza citoplasmatica del metallo. In conclusione è stato pertanto ipotizzato che, dal punto di vista funzionale, la proteina giochi un ruolo cruciale nel regolare l'omeostasi del ferro e nel ridurre la tossicità, proteggendo così il mitocondrio dal danno ossidativo ed incrementando la resistenza della cellula ai segnali apoptotici [5].

La citopenia che si manifesta in corso di anemia sideroblastica è frutto di una eritropoiesi inefficace, correlata a un midollo ipercellulare, ma prevalentemente abitato da cellule immature, che vanno incontro ad apoptosi prima di raggiungere la maturità. Cazzola e collaboratori, nel 2003, sono riusciti a stabilire che nei progenitori eritroidi midollari di pazienti affetti da anemia sideroblastica, sia ereditaria che acquisita, la maggior parte del ferro depositato nel mitocondrio è presente sotto forma di FtMt. E vi è quindi correlazione tra numero di eritroblasti positivi all'immunomarcatura per la FtMt e numero di sideroblasti ad anello. Questo studio ha permesso di aprire una nuova pagina per quanto riguarda la diagnostica delle anemie sideroblastiche, eleggendo la FtMt quale possibile *marker* specifico di mielodisplasia [6]. Studi successivi hanno permesso di dimostrare che l'espressione della proteina avviene in uno stadio molto precoce della differenziazione eritroide, in cellule ancora esprimenti l'antigene staminale CD34+ e prive di un evidente accumulo di ferro; inoltre pare che tale espressione sia correlata ad una disfunzione mitocondriale con attivazione della via intrinseca del fenomeno apoptotico [7].

Scopo del lavoro

Il riscontro che nelle anemie sideroblastiche (ARS) l'aberrante espressione di FtMt avviene molto precocemente durante la differenziazione eritroide, ha suggerito un meccanismo di regolazione genica complesso, contrastante con l'iniziale ipotesi che l'espressione di FtMt potesse essere indotta dall'accumulo di ferro [7]. L'espressione di FtMt si accompagna ad up-regolazione di geni coinvolti nel processo di maturazione eritroide e si correla al rilascio di citocromo c con innesco della via apoptotica intrinseca e aumentata sensibilità della cellula ai fattori in grado di innescare la via apoptotica estrinseca [8]. Anche se i meccanismi di regolazione dell'espressione di FtMt sono ancora sconosciuti e non è noto se l'abnorme espressione di FtMt sia la causa o il risultato dell'accumulo di ferro nei mitocondri, nonostante sia evidente il suo ruolo critico nella patogenesi dell'eritropoiesi inefficace delle ARS. Riveste quindi un sicuro interesse l'utilizzo di modelli cellulari basati su colture di progenitori emopoietici trasdotti con lentivirus allo scopo di chiarire gli effetti funzionali e i meccanismi molecolari con cui l'espressione di FtMt induce la prematura morte cellulare.

Materiali e metodi

Per il nostro studio è stato necessario isolare, dalle cellule mononucleate midollari di 8 donatori normali separate mediante centrifugazione secondo gradiente di densità (Lymphoprep, Axix-Shield, Oslo, Norway), gli elementi midollari immaturi, esprimenti l'antigene staminale di superficie CD34. L'isolamento è stato praticato per selezione positiva (purezza >90%), usando il MiniMac system (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). Le cellule ottenute sono state messe in coltura a partire da una concentrazione di 0.1×10^6 /mL. Le cellule isolate sono state trasdotte mediante vettori lenti virali mediante una procedura di trasduzione lenti virale effettuata presso l'istituto di terapia genica dell'ospedale Vita e Salute San Raffaele di Milano. Il cDNA di FtMt è stato subclonato sotto il controllo del promotore ubiquitario fosfoglicerochinasi (PGK) nel vettore pCCL.sin.eGFP.WPRE [9] per generare il costrutto di espressione lentivirale pPGKMT. I vettori lentivirali pPGKMT (LV-FtMt) o i vettori pPGKGFP (LV-GFP) per la *Green Fluorescent Protein* (GFP), utilizzata come controllo, sono stati prodotti da co-trasfezione transiente con quattro plasmidi nelle cellule 293T. Diluizioni differenti dei vettori sono state usate per trasdurre le cellule target. Dopo 48 ore, cellule fluorescenti grazie alla presenza di GFP sono state visualizzate usando un microscopio a fluorescenza per testare l'efficienza della trasduzione. Le cellule trasdotte con la diluizione del virus che ha dato il miglior risultato per GFP sono state testate per l'espressione FtMt facendole crescere per diversi giorni. Il contenuto di FtMt è stato determinato mediante uno specifico test ELISA.

Le cellule CD34 positive sono state coltivate per 14-21 giorni in Iscove Medium (Euroclone, Milano), con supplementazioni standard di interleuchina-3 umana ricombinante (rhIL-3, 10 ng/mL; Prepo Tech House, Tebu-Bio, Milano), rh-IL-6 (10 ng/mL; Prepo Tech House, Tebu-Bio, Milano), e fattore rh-SC (25 ng/mL; Prepo Tech House). Al giorno 4 il mezzo è stato arricchito con citochine, per mantenere le colture alla stessa concentrazione cellulare. Eritropoietina umana ricombinante (rh-Epo, 2 IU/mL; Janssen Cilag, Milano) è stata aggiunta al mezzo in settima giornata e nuovo mezzo più Epo sono stati aggiunti nei giorni 11, 14 e 18. Nei giorni 0, 4, 7, 11, 14, 18 e 21 è stato possibile allestire dei citocentrifugati su vetrino (500 r.p.m. per 10 minuti) per effettuare l'analisi morfologica e immunocitochimica delle cellule in coltura e inoltre sono stati prelevati campioni per effettuare altri studi biologici. Allo scopo di valutare la differenziazione eritroide delle cellule in coltura, il fenotipo è stato analizzato mediante la citometria a flusso. Per eseguire questa metodica sono stati usati i seguenti anticorpi monoclonali: anti-CD34, anti-CD45, anti-CD36 (antigene espresso sui progenitori eritroidi), anti-CD71 (recettore per la transferrina), anti-Glicoforina A. In aggiunta, su citocentrifugati preparati agli stessi tempi, abbiamo effettuato la colorazione di May-Grünwald Giemsa e, per stimare la presenza di sideroblasti ad anello, la colorazione del Perls. Per valutare il numero di BFU-E (colonie eritroidi), nei giorni 0, 7 e 14, le cellule coltivate sono state collocate in un 1 ml di metilcellulosa (MethoCult GFH4434, StemCell Technologies, Vancouver, Canada) in presenza di FBS 30%, 10ng/mL di IL-3, 10 ng/mL di GM-CSF, 50 ng/mL di SCF e 3 IU/mL di rhEpo. Dopo 14 giorni di incubazione a 37 °C, 5 % CO₂, il numero di BFU-E è stato valutato mediante l'utilizzo di un microscopio invertito. Colonie singole sono state isolate usando una micropipetta per effettuare analisi molecolari o allestire citocentrifugati. I citocentrifugati sono stati immunomarcati per evidenziare la presenza delle isoforme ferritiche Mt ed H. A tale scopo è stata utilizzata una metodica immunoenzimatica indiretta amplificata con la tecnologia dei polimeri. Il protocollo prevede di fissare i campioni e di incubarli con l'anticorpo primario; dopo un breve lavaggio in tampone tris-salino viene aggiunto il polimero di destrano a cui sono legate numerose molecole sia di anticorpo secondario che di enzima, che in questo caso è rappresentato dalla fosfatasi alcalina. L'avvenuto legame antigene-anticorpo può essere evidenziato sotto forma di precipitati rossi dovuti all'azione dell'enzima rivelatore sul substrato cromogeno. I controlli

negativi sono stati ottenuti sostituendo l'anticorpo primario con un siero di capra non immune opportunamente diluito. Anticorpi primari utilizzati: anticorpo primario policlonale di coniglio anti-FtMt diluito 1:500 in TBS, anticorpo primario monoclonale murino anti-ferritinina H (clone RHO2) diluito 1:800 in TBS. L'attività proliferativa cellulare è stata valutata mediante immunocitochimica, utilizzando un anticorpo monoclonale contro l'antigene nucleare Ki-67 (anticorpo primario monoclonale di coniglio anti-Ki-67 diluito 1:50 in TBS, clone SP6, Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA). A tale scopo abbiamo utilizzato la stessa metodica già descritta per l'immunomarcatura anti-FtMt. In questo caso il preparato deve essere fissato in acetone, per 10 minuti, e poi incubato con l'appropriato anticorpo primario. L'indice apoptotico è stato valutato utilizzando la metodica TUNEL mediante un kit commerciale fornito dalla Roche ("In situ cell death detection kit, AP", Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). I vetrini fissati sono stati incubati a 37°C con la miscela di oligonucleotidi fluoresciniti-TdT per un'ora; dopo un lavaggio in tampone salino, sono stati quindi incubati a 37°C con l'anticorpo monoclonale murino anti-fluorescina coniugato con l'enzima rivelatore (fosfatasi alcalina) per 45 minuti. Infine, dopo un lavaggio in tampone salino e dopo incubazione con il substrato-cromogeno, l'avvenuto legame antigene-anticorpo è stato evidenziato sottoforma di precipitati rossi dovuti all'azione dell'enzima rivelatore sul substrato cromogeno. Il controllo negativo è stato ottenuto omettendo la TdT dalla miscela enzima-nucleotidi. Allo scopo di indagare l'attività proliferativa, l'indice apoptotico e l'espressione della isoforma H della ferritina, in cellule che esprimono o meno la FtMt, è stato necessario mettere a punto delle reazioni immunocitochimiche in doppio, in grado di evidenziare sul medesimo campione la presenza di: FtMt e FH, FtMt e apoptosi, FtMt e attività proliferativa, GFP e FH, GFP e apoptosi, GFP e attività proliferativa. Tali reazioni, ad esclusione delle doppie FtMt/apoptosi e GFP/apoptosi, sono state eseguite grazie all'utilizzo di un kit fornito dalla ditta DAKO EnVision, G/2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red) il quale sfrutta la tecnologia dei polimeri e utilizza come cromogeni la diaminobenzidina e il permanent red. Per quanto riguarda invece le due reazioni in doppio FtMt/apoptosi, GFP/apoptosi, è stato necessario utilizzare la metodica TUNEL, allo scopo di rilevare l'indice apoptotico, combinata con l'impiego del kit sopraccitato, utilizzato per evidenziare FtMt, oppure GFP, mediante il cromogeno DAB. La lettura dei preparati colorati con le reazioni citochimiche e con le immunomarcature è stata effettuata al microscopio ottico ad un ingrandimento di 1250x (obiettivo ad immersione). Per ogni campione è stata determinata la percentuale di elementi nucleati positivi contando almeno 500 cellule. Per l'analisi statistica descrittiva delle variabili sono stati calcolati la media, l'errore standard ed il *range*. Tutti i test statistici erano a due code ed un valore di $p < 0.05$ veniva considerato statisticamente significativo. Per il calcolo sono stati utilizzati i seguenti *software*: Statistica 8.0, MedCalc® 9.3 e Microsoft Excel® 2000.

Risultati

Nelle cellule trasdotte per la FtMt l'espressione della proteina è risultata essere presente durante tutto il periodo di coltura, come dimostrato sia mediante immunoblotting (Figura 3) che mediante immunocitochimica. La FtMt era localizzata in corrispondenza di numerosi granuli disposti attorno al nucleo; questo *pattern* di espressione era suggestivo di una localizzazione mitocondriale (Figura 4). La percentuale di cellule esprimenti FtMt tendeva a ridursi gradualmente nel tempo. Tra le cellule trasdotte con GFP o non trasdotte (controlli) sono stati osservati solo rari elementi FtMt+ (Figura 5).

La differenziazione eritroide è stata valutata in determinate giornate di coltura, mediante tecnica di citometria a flusso. Tale valutazione ha permesso di evidenziare un continuo aumento delle cellule eritroidi durante il periodo di coltura, sia nei campioni non trasdotti che in quelli trasdotti. Al giorno

14 la maggior parte delle cellule è risultata infatti essere Glicoforina A+ e più dell'80% esprimeva CD36 e CD71. La trasduzione lentivirale dei normali progenitori CD34+ quindi non inibiva la loro capacità di differenziazione; in diciottesima giornata sono stati osservati molti eritroblasti maturi, mentre in ventunesima giornata sono stati osservati molti eritrociti (Figura 6). Alla colorazione di Perls, in modo interessante, nei campioni trasdotti coltivati in presenza di transferrina ferrica, negli ultimi stadi di coltura si osservavano alcuni elementi con granuli azzurro-verdi disposti secondo il tipico pattern a corona perinucleare.

Abbiamo osservato che la trasduzione lentivirale non inibiva la crescita cellulare, come dimostrato dal conteggio di cellule vitali a vari tempi di coltura (Figura 7) e dalla valutazione dell'attività proliferativa mediante lo studio dell'espressione dell'antigene nucleare Ki-67, espresso dalle cellule in proliferazione (Figure 8 e 9). Anche con la tecnica di doppia marcatura immunocitochimica non sono state evidenziate alcune differenze significative nell'indice di proliferazione tra cellule esperimenti FtMt o GFP e loro controparti negative ($P=0.02$) (Figura 10).

Anche la crescita delle unità formanti *burst* eritroidi (BFU-E) è risultata essere simile nei campioni CD34+ trasdotti per FtMt o GFP e non trasdotti ($P>0.05$ a tutti i tempi esaminati). La capacità clonogenica delle cellule esperimenti FtMt è stata inequivocabilmente dimostrata con metodo immunocitochimico (Figure 11 e 12). In due su dieci colonie isolate mediante micropipetta da campioni trasdotti per la FtMt e citocentrifugati su vetrino, la maggior parte delle cellule apparivano FtMt positive, mentre tutte le colonie ottenute da campioni di controllo erano completamente negative.

Mediante l'utilizzo della metodica TUNEL abbiamo osservato che l'apoptosi aumentava durante il tempo di coltura in tutti i campioni, sia costituiti da cellule trasdotte per GFP o FtMt che non trasdotti; tuttavia tale aumento tendeva ad essere più marcato nei campioni trasdotti per FtMt al giorno 14 ($P=0.07$) (Figure 13 e 14). Anche la tecnica di doppia marcatura ha evidenziato un indice apoptotico significativamente più elevato nelle cellule FtMt+ rispetto a quelle FtMt-, nei giorni 14 e 21 ($P<0.001$). Non sono state invece osservate differenze tra cellule GFP+ e GFP- a qualunque tempo di coltura (Figura 15).

La ferritina H citosolica risultava essere espressa in tutti i campioni, tuttavia si è osservato che al giorno 7, dopo trasduzione per FtMt, la percentuale media di cellule positive risultava significativamente inferiore che dopo trasduzione per GFP o in cellule non trasdotte ($P<0.001$) (Figure 16 e 17). Mediante doppia marcatura immunocitochimica abbiamo infine confermato che l'espressione di FH era significativamente ridotta nelle cellule FtMt+ a tutti i tempi. Al contrario non sono state notate differenze in relazione all'espressione di GFP (Figura 18).

Discussione

Recenti studi hanno dimostrato che nelle cellule della serie eritroide delle sindromi mielodisplastiche a basso rischio il processo apoptotico ha inizio in uno stadio molto precoce di differenziazione e si associa a disfunzioni a carico dei mitocondri. Nelle ARS, il più frequente sottogruppo di anemie sideroblastiche, caratterizzato da eritropoiesi inefficace associata ad accumulo di ferro nei mitocondri degli eritroblasti, pare essere rilevante il ruolo delle vie intrinseche mitocondriali nell'attivazione dei meccanismi apoptotici; nonostante non sia ancora stato pienamente chiarito il meccanismo patogenetico di base che causa il malfunzionamento mitocondriale, diversi studi hanno evidenziato una correlazione tra alterazione mitocondriale e anomalie a carico dell'omeostasi del ferro. È noto che nelle anemie sideroblastiche congenite e acquisite possono riscontrarsi lesioni a carico del DNA mitocondriale a livello di geni che codificano per enzimi di trasporto di elettroni. Questi difetti causano la formazione di depositi patologici di ferro nei mitocondri. L'eccessivo accumulo di ferro e la conseguente iperproduzione di ROS, dovuti alla disfunzione mitocondriale, possono giocare un ruolo chiave nei meccanismi

fisiopatologici dell'anemia nelle [10]. In modo interessante, il nostro gruppo ha dimostrato che nei sideroblasti ad anello i depositi di ferro evidenziabili nei mitocondri sono presenti in forma di FtMt, la quale è espressa già a partire dagli stadi precoci di differenziazione eritroide, prima dell'evidente accumulo di ferro [7]. Parallelamente alla sovraespressione di FtMt nei progenitori eritroidi si osserva una alterata regolazione di geni coinvolti nel processo di differenziazione eritroide, associata al rilascio di citocromo c e a conseguente avvio della via intrinseca, e successivamente estrinseca, dell'apoptosi [7-11]. In questo lavoro abbiamo cercato di chiarire il meccanismo mediante il quale la FtMt può indurre prematura morte cellulare nei progenitori eritroidi. A tal scopo abbiamo studiato gli effetti funzionali della sovraespressione di FtMt su differenziazione eritroide, capacità clonogenica, apoptosi e proliferazione e abbiamo valutato la capacità della FtMt di indurre un fenotipo sideroblastico in progenitori eritroidi originati da cellule staminali normali trasdotte con lentivirus. Abbiamo utilizzato una procedura ben standardizzata, che ha permesso di produrre eritrociti in vitro a partire da cellule staminali midollari mediante trasduzione lentivirale. Siamo riusciti ad ottenere in eritroblasti normali una quantità di proteina espressa pari a 30-100 ng su 1 mg di proteine totali. Tale valore risulta essere circa 10 volte più elevato rispetto alla quantità osservata in cellule HeLa trasfettate, utilizzate in precedenti studi sperimentali. Tuttavia, dal momento che il protocollo da noi utilizzato aveva un'efficienza di trasduzione intorno al 30%, abbiamo deciso di valutare gli effetti funzionali della FtMt nelle singole cellule, mediante tecniche di doppia immunomarcatura. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la sovraespressione di FtMt era in grado di ridurre il contenuto citosolico di ferritina H, aumentando l'espressione di CD71, quadro compatibile con una condizione di deplezione del ferro citosolico, e al tempo stesso era in grado di aumentare l'indice apoptotico. In alcune cellule è stato addirittura possibile osservare la comparsa di granuli Perls positivi disposti ad anello, attorno al nucleo. Abbiamo quindi ipotizzato che, come conseguenza di un continuo incremento progressivo della captazione di ferro, la FtMt possa potenzialmente degradarsi in molecola simil-emosiderinica redox attiva, evidenziabile con la reazione del Perls, in grado di determinare danno mitocondriale e quindi apoptosi della cellula. La sovraespressione di FtMt, potrebbe, modificando la disponibilità di ferro mitocondriale e danneggiando il mitocondrio, condurre a una condizione di eritropoiesi inefficace. In effetti, in modo interessante, il fenotipo da noi osservato nei progenitori normali trasdotti è risultato simile a quello dei progenitori eritroidi di pazienti con anemia sideroblastica.

Tabelle e figure

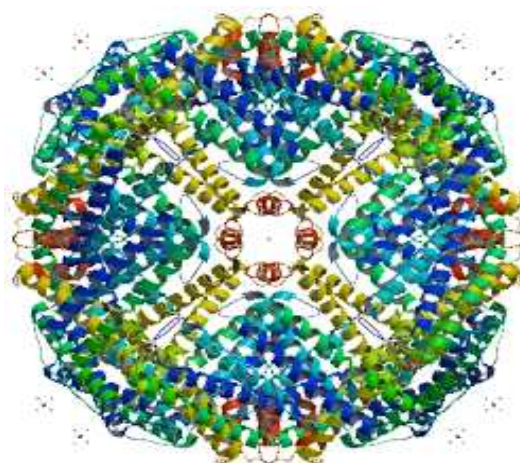


Figura 1. Struttura della ferritina mitocondriale.

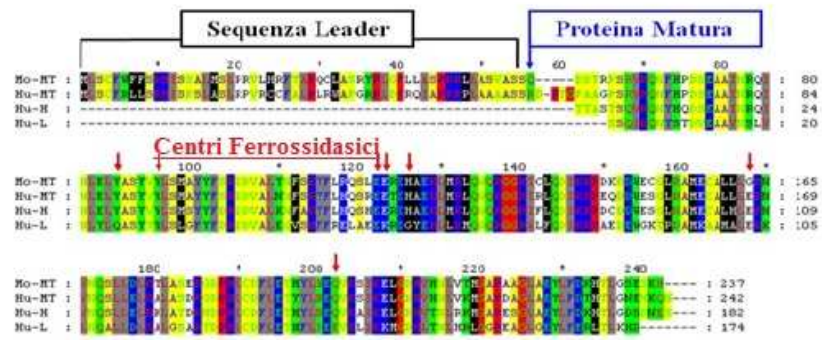


Figura 2. Sequenza aminoacidica della ferritina mitocondriale.

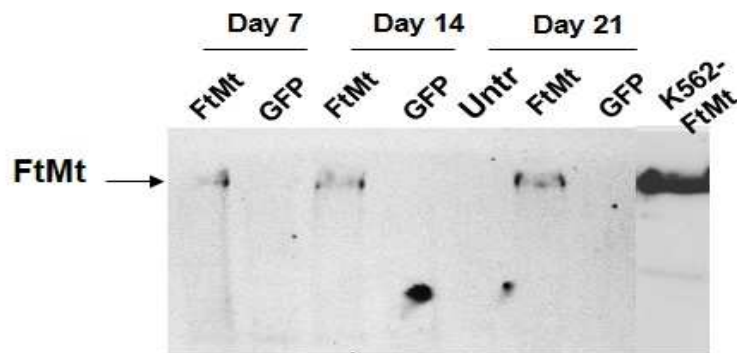


Figura 3. Immunoblotting.

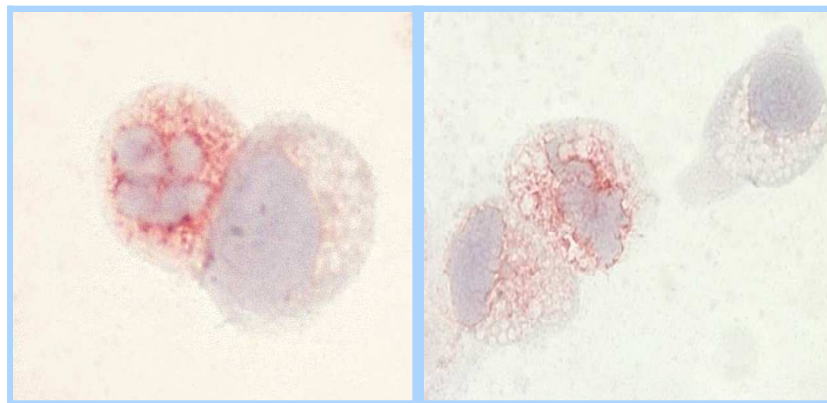


Figura 4. Pattern di espressione della FtMt, analizzato mediante immunocitochimica. È ben evidente la localizzazione perinucleare dei granuli (ingrandimento di 1250x).

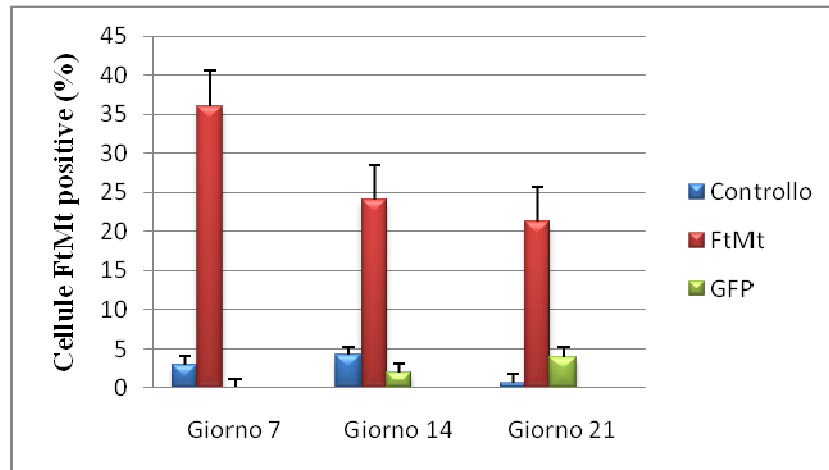


Figura 5. Espressione della ferritina mitocondriale, a vari tempi di coltura (valore medio \pm errore standard).

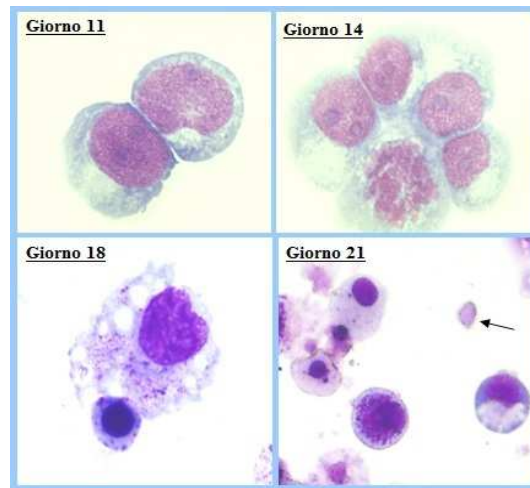


Figura 6. Differenziazione cellulare, messa in evidenza mediante colorazione di May-Grünwald Giemsa. Al giorno 11 e 14 sono osservabile elementi di grandi dimensioni, basofili, nucleolati, simili ai proeritroblasti; al giorno 18 si nota la comparsa di eritroblasti policromatofili e ortocromatici; al giorno 21 sono visibili anche alcuni eritrociti (Freccia). Ingrandimento di 1250x.

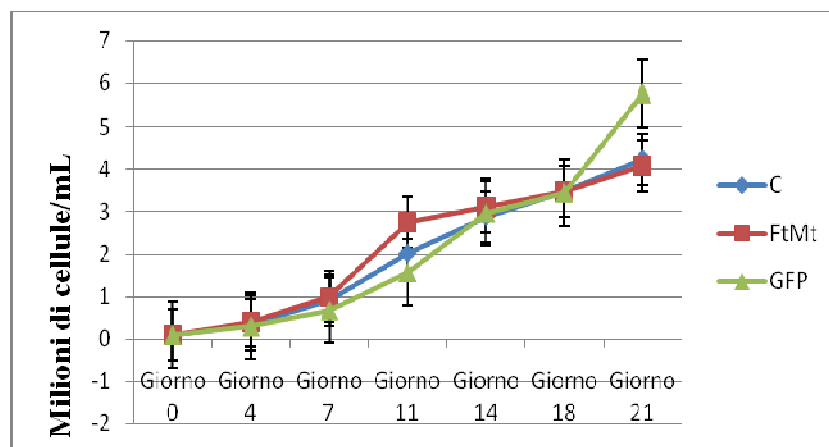


Figura 7. Numero di cellule vitali valutato in vari tempi di coltura (media \pm errore standard).

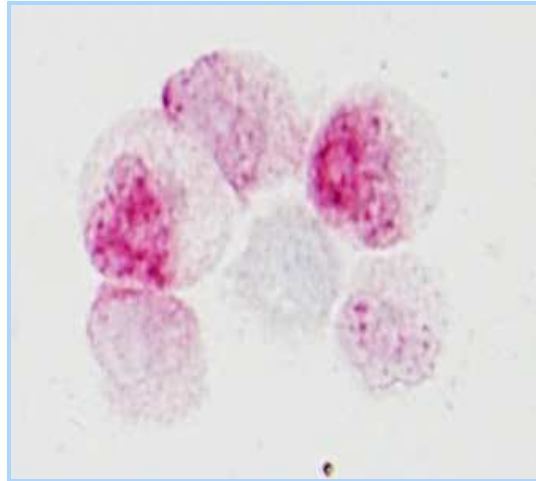


Figura 8. Evidenziazione immunocitochimica dell'antigene nucleare Ki-67 in cellule CD34+ trasdotte per la FtMt (quattordicesima giornata. Ingrandimento di 1250x).

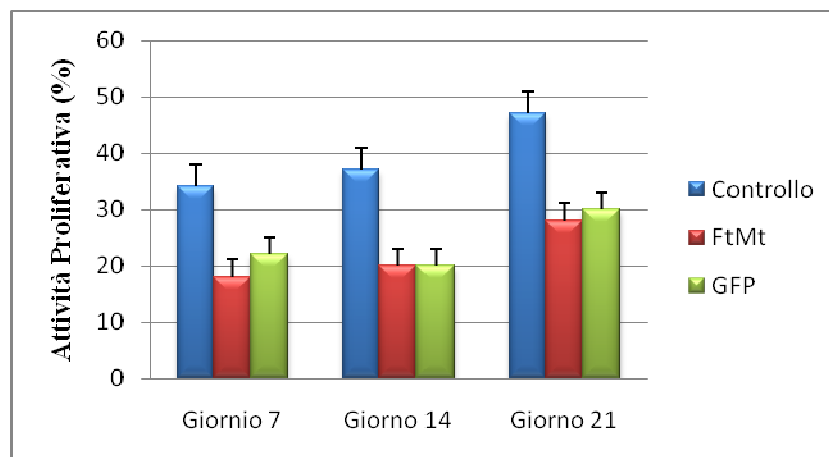


Figura 9. Attività proliferativa durante il periodo di cultura, espressa come percentuale di cellule positive all'immunomarcatura per l'antigene Ki-67 (media±errore standard).

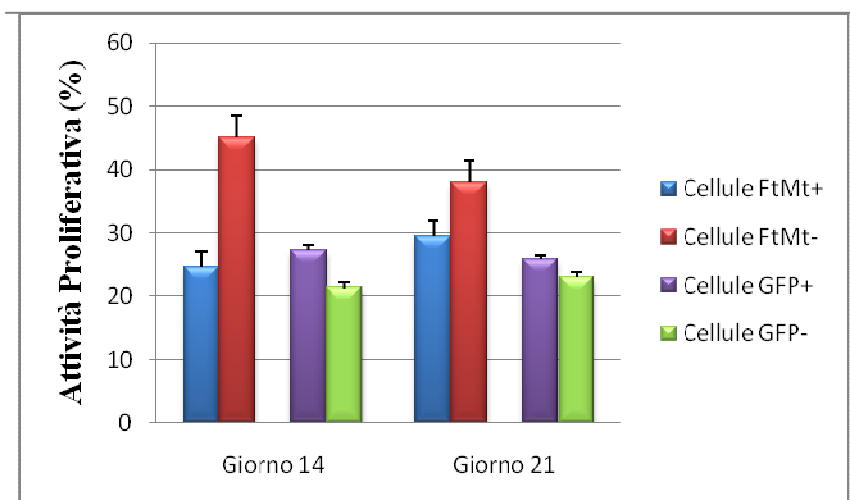


Figura 10. Valutazione dell'attività proliferativa in cellule trasdotte con FtMt e con GFP (media±errore standard).

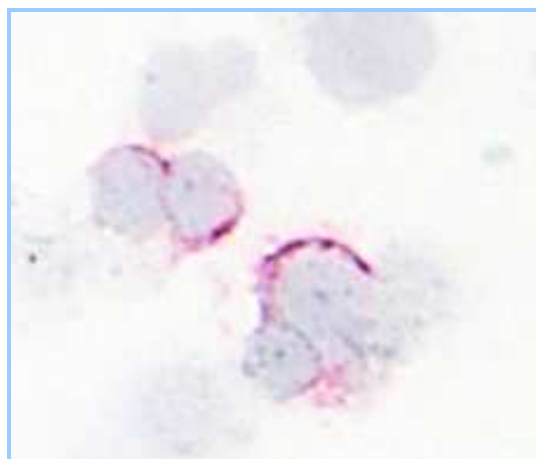


Figura 11. Espressione di FtMt in colonie BFU-E derivate da campioni trasdotti per FtMt (ingrandimento di 1250x).

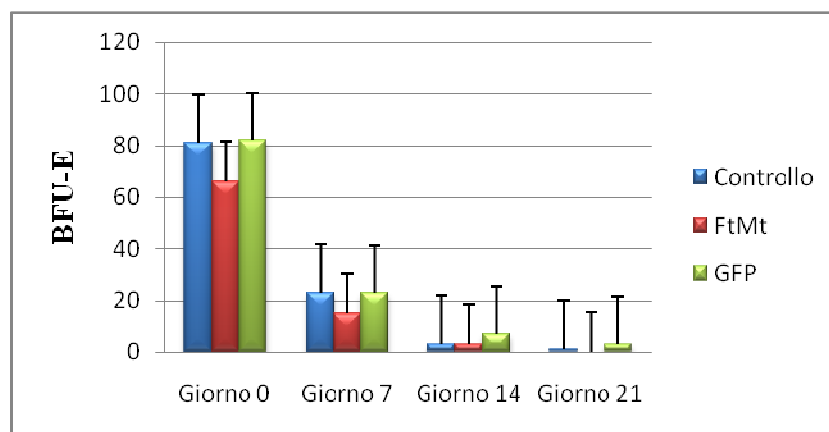


Figura12. Numero di colonie BFU-E (media±errore standard).

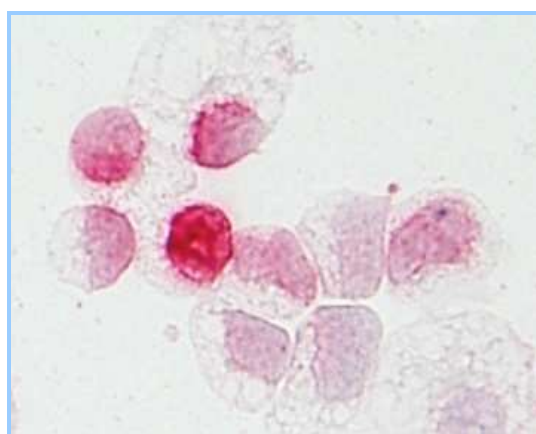


Figura 13. La metodica TUNEL (giornata 14) evidenzia intensa positività nucleare in cellule trasdotte per FtMt (ingrandimento di 1250x).

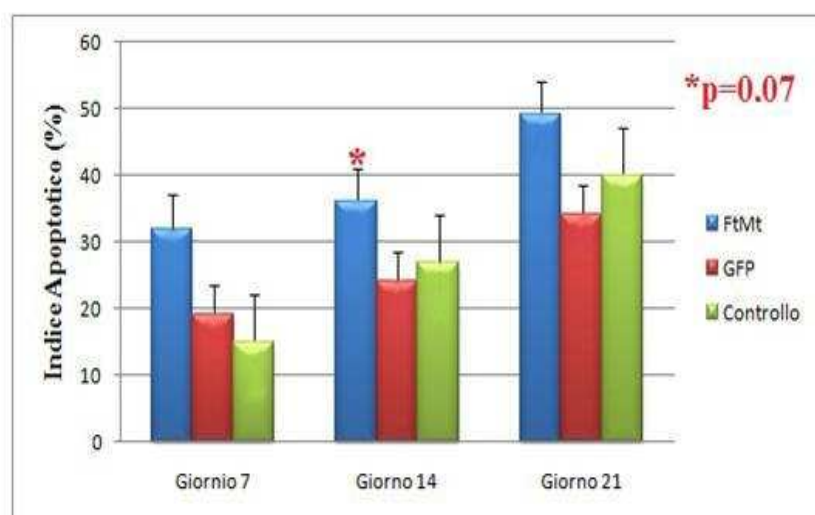


Figura 14. Indice apoptotico durante il periodo di coltura (media±errore standard).

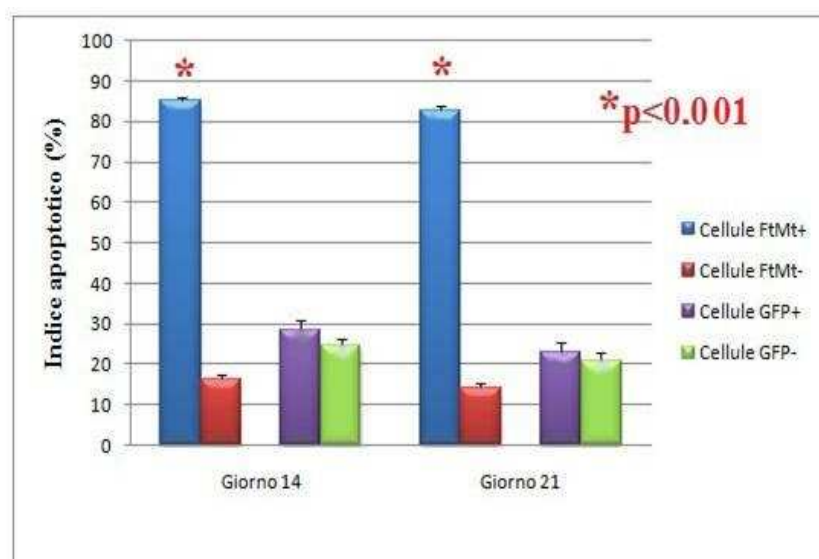


Figura 15. Valutazione mediante tecnica di doppia marcatura dell'indice apoptotico in cellule esprimenti o meno FtMt o GFP (media±errore standard).

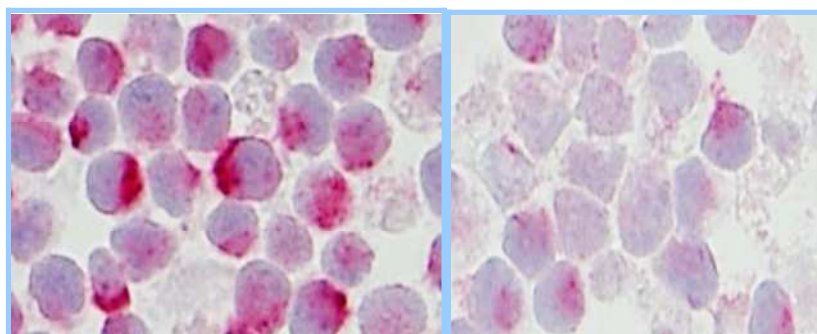


Figura 16. Immunocitochimica in quattordicesima giornata. Nell'immagine a sinistra si evidenzia l'espressione di FH in cellule trasdotte per GFP; a destra la sua espressione in cellule trasdotte per FtMt. È evidente la ridotta espressione di FH in cellule esprimenti FtMt (ingrandimento di 1250x).

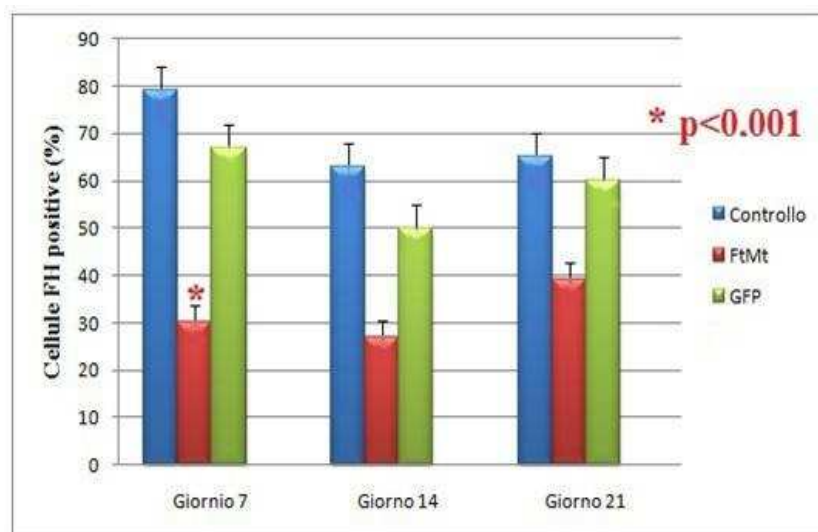


Figura 17. Espressione della FH durante il periodo di coltura (media±errore standard).

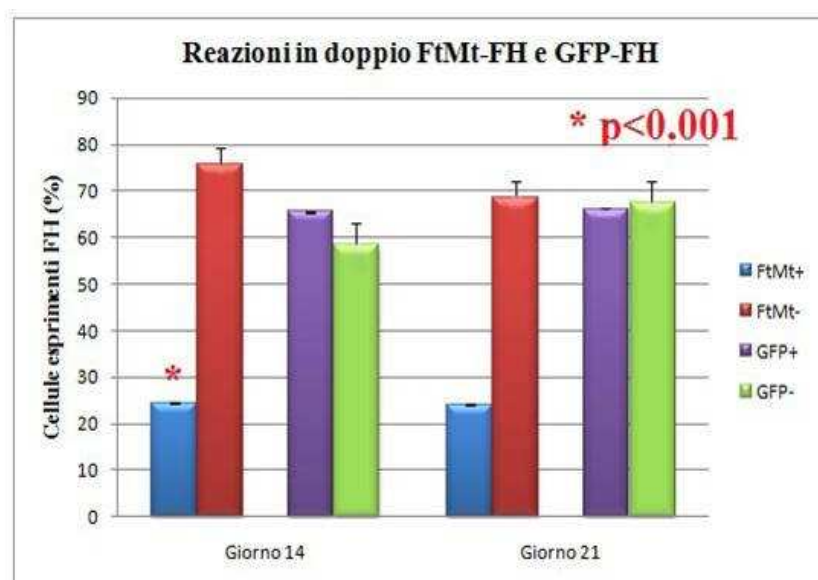


Figura 18. Valutazione dell'espressione di FH in cellule trasdotte per FtMt e per GFP (media±errore standard).

Bibliografia

1. Levi S, Arosio P. Mitochondrial ferritin. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1887-1889.
2. Santambrogio P, Biasiotto G, Sanvito F et al. Mitochondrial ferritin expression in adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 2007;55:1129-1137.
3. Drysdale J, Arosio P, Invernizzi R et al. Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2002;29:376-383.
4. Corsi B, Cozzi A, Arosio P et al. Human mitochondrial ferritin expressed in HeLa cells incorporates iron and affects cellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2002;277:22430-22437.
5. Arosio P, Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2002;33:457-463.
6. Cazzola M, Invernizzi R, Bergamaschi G et al. Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with Sideroblastic Anemia. *Blood* 2003;101:1996-2000.
7. Tehranchi R, Invernizzi R, Grandien A et al. Aberrant mitochondrial iron distribution and maturation arrest characterize early erythroid precursors in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005;106:247-253.

8. Tehranchi R, Fadeel B, Forsblom AM et al. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome c release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors. *Blood* 2003;101:1080-1086.
9. Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S et al. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 2000;25:217-222.
10. Invernizzi R, Travaglio E. Increased apoptosis as a mechanism of ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes. *Clinical Leukemia* 2008;2:113-120.
11. Nikpour M, Pellagatti A, Liu A et al. Gene expression profiling of erythroblasts from refractory anaemia with ring sideroblasts (RARS) and effects of G-CSF. *Br J Haematol* 2010;149:844-854.