

**ASSOCIAZIONE VENETA  
PER LA LOTTA ALLA TA-  
LASSEMIA (AVLT)**

(e.z.) Dal dicembre 2002, l'AVLT sostiene con borse di studio l'attività del Laboratorio del Prof. Stefano Rivella a New York.

Come è giusto che sia, il Prof. Rivella tiene informato l'AVLT sull'evoluzione del lavoro del suo gruppo e, al riguardo, ci invia annualmente una relazione.

La più recente riferisce sull'attività svolta nel 2006 e dà indicazioni sul programma per l'anno 2007.

Ci pare utile renderla pubblica, perché è altrettanto giusto che chi contribuisce a tener viva l'attività dell'AVLT debba essere informato sui risultati della ricerca finanziata.

A questo proposito, si informa che chi volesse porre domande al Prof. Rivella sulla sua ricerca può farlo tramite l'e-mail [info@avlt.it](mailto:info@avlt.it). Avrà il piacere di ricevere risposte direttamente da lui su questo periodico.

Il gruppo del Prof. Rivella ha ottenuto recentemente un notevole riconoscimento internazionale con la pubblicazione sulla importante rivista scientifica *Blood* del seguente lavoro di ricerca:

Sara Gardenghi, Maria F Marongiu, Pedro Ramos, Ella Guy, Laura Breda, Amy Chadburn, YiFang Liu, Ninette Amariglio, Gideon Rechavi, Eliezer A Rachmilewitz, William Breuer, Z. Ioav Cabantchik, Diedra M Wrighting, Nancy C Andrews, Maria de Sousa, Patricia J Giardina, Robert W Grady, and Stefano Rivella

**Ineffective erythropoiesis in  $\alpha$ -thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin**

*Blood*, Feb 2007;  
doi:10.1182/blood-2006-09-048868

Dopo la relazione, riportiamo il "servizio" che il Corriere della Sera ha dedicato sul suo sito internet al lavoro pubblicato su *Blood*.

# RELAZIONE SULL'ATTIVITÀ DI RICERCA AL WEILL MEDICAL COLLEGE (WMC) DELLA CORNELL UNIVERSITY

**Laboratorio di Stefano Rivella**

**Anno: 2006-2007.**

**Uso del vettore TNS9 nelle cellule ematopoietiche di pazienti talassemici (Dottorssa Laura Breda)**

E' possibile isolare cellule che daranno origine ad eritrociti da sangue di pazienti talassemici. Queste cellule, normalmente, non sono in grado di produrre emoglobina. Al contrario, se infettate con il vettore TNS9, potrebbero essere corrette e ripristinare la loro funzione. Queste cellule, anche se corrette, non possono essere reintrodotte nel paziente. Tuttavia, possono fornirci importanti informazioni sulla validità, o meno, di quest'approccio terapeutico. Lo scopo di questo progetto è di diagnosticare in vitro la risposta al vettore da parte di cellule che in vivo non producono alcun RNA messaggero o che producono quantità variabili o mutate. Lo scopo di questi esperimenti è di generare un test pre-clinico per accumulare importanti indicazioni, paziente per paziente e nella comunità talassemica in generale, sulla probabilità che il trasferimento genico sia efficace o meno.

In collaborazione con il professor Eitan Fibach dell'Hadassah Medical Center di Gerusalemme in Israele e con il Thal-Lab del professor Roberto Gambari dell'Università di Ferrara sono state selezionate cellule di pazienti con diverso genotipo. Le cellule, prelevate dal sangue periferico, sono poi state trattate con

il vettore TNS9. Le emoglobine prodotte (fetali, ed adulte) sono state analizzate qualitativamente e quantitativamente tramite cromatografia liquida ad alta efficienza (HPLC). In tutti i casi analizzati sono stati apprezzati aumenti della percentuale d'emoglobina adulta. A questo punto sulle medesime cellule sono stati analizzati i valori di RNA messaggero e la quantità di vettore integrato nel DNA. Questa analisi è stata necessaria ai fini di stabilire una correlazione tra il numero di molecole di vettore inserito con il livello di trascrizione genica e dell'espressione proteica già analizzata. Utilizzando quantità a scalare del vettore sullo stesso numero di cellule abbiamo ottenuto un numero di copie integrate del vettore superiore, uguale o al di sotto di una copia per cellula. I diversi gruppi di cellule sono stati poi stimolati al differenziamento con agenti chimici e analizzati dal punto di vista delle globine trascritte. L'incremento del numero di copie è stato proporzionale all'aumento del messaggero della beta globina.

La Dottorssa Laura Breda ha intrapreso un viaggio di lavoro, in modo da ottimizzare il sistema d'infezione col vettore lentivirale sulle cellule dei pazienti talassemici in entrambi i laboratori. Le quantità di vettore utilizzato sono state ridotte dopo aver constatato che, in colture cellulari da donatori normali, l'efficienza d'infezione nei progenitori eritroidi umani è

# TERAPIA GENICA: DALLA PRIMA ALLA SECONDA FASE DEL PROGETTO

molto elevata e superiore a quella in cellule murine. Sia a Ferrara che a Gerusalemme gli esperimenti condotti hanno previsto l'uso di quantità di vettore a scalare, poiché il grado d'infezione nei diversi pazienti è incognito. L'analisi dell'integrazione genomica ha confermato la presenza di un numero di copie di vettore al di sotto o simile ad una copia per cellula, requisito fondamentale per un approccio sicuro di terapia genica in vivo nei pazienti. Per una parte di pazienti, il numero di cellule e il loro livello di differenziamento eritroide hanno permesso un'analisi solo a livello di DNA (numero di copie) e di RNA (espressione delle globine alfa beta e gamma). Nei casi in cui il numero di cellule lo ha consentito, sono anche state valutate le quantità d'emoglobina (sia fetale che adulta) tramite HPLC. Le analisi sulle cellule dei pazienti hanno mostrato un incremento dell'espressione globinica, ma per la quantificazione finale sarà necessario analizzare un più largo numero di cellule pazienti.

Conclusa la prima fase sullo studio dell'infezione dei pazienti affetti da talassemia con il vettore TNS9 (messa a punto di tecniche d'analisi e quantità di vettore da utilizzare), la Dottoressa Breda sta ora occupandosi della seconda fase del progetto avente lo scopo di valutare il potenziale terapeutico del vettore in un numero maggiore di pazienti.

**Ruolo della proteina epcidina**

**dina (Dr.ssa Sara Gardenghi e Dr.ssa Maria Franca Marongiu).**

Abbiamo terminato la prima parte dei nostri studi sul ruolo della proteina epcidina nell'assorbimento del ferro in talassemia. La proteina epcidina è prodotta nel fegato, rilasciata nel sangue e, tramite il sistema circolatorio, raggiunge l'intestino dove agisce sulla proteina trasportatrice ferroportina. L'epcidina produce la degradazione della ferroportina, regolando l'assorbimento di ferro dalla dieta. Se i livelli d'epcidina sono bassi si assorbe più ferro, mentre se sono elevati si riduce la quantità di ferro che entra nel nostro organismo.

In topi normali resi anemici in maniera transitoria, la quantità d'epcidina diminuisce, poiché il ferro è richiesto per produrre i globuli rossi mancanti. Se al contrario negli stessi topi si inietta del ferro, il livello d'epcidina aumenta per prevenire un eccesso di ferro. I nostri dati indicano che, in topi con talassemia intermedia e major, in assenza di trasfusioni di sangue, gli organi (fegato, milza, cuore e rene) sono sovraccarichi di ferro. E' importante sottolineare che la talassemia è una condizione particolare in cui anemia (che dovrebbe ridurre la produzione d'epcidina) e il sovraccarico di ferro (che, al contrario, dovrebbe aumentare la produzione d'epcidina) coesistono. Primo passo nel nostro studio, quindi, è stato quello di determinare chi, tra anemia ed eccesso di ferro, determina i livelli d'epcidina in talasse-

mia.

I dati ottenuti dalla Dottoressa Gardenghi indicano che, nei topi affetti da talassemia intermedia e major, i livelli di epcidina sono al di sotto della norma. L'espressione d'epcidina e la distribuzione di ferro nei tessuti, quindi, sono influenzati prevalentemente dal grado di anemia, che dipende dall'età e dalla severità della malattia. In condizioni di bassamoderata anemia (topi di 2 mesi affetti da talassemia intermedia) l'espressione di epcidina è ridotta ed il ferro in eccesso si accumula di preferenza nella milza dove può essere utilizzato per la produzione di nuove cellule rosse. In casi di grave anemia (topi affetti da talassemia major e animali con talassemia intermedia ad un anno d'età) la situazione diviene più complessa. Il ferro si accumula prevalentemente nel fegato, mentre i livelli d'epcidina aumentano (per l'elevato accumulo di ferro), ma non proporzionalmente alla quantità di ferro misurata negli animali, poiché l'anemia continua a prevalere sul sovraccarico di ferro. Contemporaneamente, abbiamo per la prima volta evidenziato che, nonostante i livelli d'epcidina siano accresciuti, l'assorbimento di ferro rimane elevato grazie ad un aumento nell'espressione della ferroportina. Quindi, anche questo trasportatore ha un ruolo fondamentale nel determinare l'eccesso di ferro in talassemia. Per riprodurre il più possibile le condizioni dei pazienti talassemici, la Dottoressa Gardenghi ha, inoltre, trasfuso gli animali, migliorando l'anemia e il sovraccarico di ferro.

L'osservazione che i livelli d'epcidina sono ridotti in talassemia, ci ha indotto a studiare la possibilità di amministrare o aumentare la produzione di questa proteina da parte del fegato dei topi talassemici. In futuro considereremo quest'approccio.

Conclusa la prima fase sullo studio del ruolo dell'epcidina e del metabolismo del ferro in talassemia (una pubblicazione è già stata accettata dalla rivista ematologica Blood), la Dottoressa Gardenghi sta ora occupandosi

della seconda fase del progetto avente lo scopo di valutare il potenziale terapeutico della proteina hepcidina in talassemia.

La Dottoressa Marongiu ha inizialmente affiancato la Dottoressa Gardenghi allo scopo di apprendere le tecniche per la preparazione dei vettori lentivirali e nello sviluppo dei progetti descritti in precedenza. La Dott.ssa Marongiu è adesso coinvolta in un progetto che prevede lo studio della distribuzione del ferro nei vari organi (principalmente fegato, milza, cuore e intestino) di topi affetti da talassemia intermedia e major posti in precedenza in dieta normale o a basso dosaggio di ferro. C'interessa capire quanto e come influisce il ferro assunto con la dieta nell'accumulo di ferro osservato nei topi talassemici.

I lavori indicati con il doppio asterisco indicano, o indicheranno, che i lavori delle Dottoresse Breda e Gardenghi sono stati sponsorizzati dall'AVLT.

\*\*Sara Gardenghi, Maria F. Marongiu, Pedro Ramos, Ella Guy, Laura Breda, Amy Chadburn, YiFang Liu, Ninette Amariglio, Gideon Rechavi, Eliezer A. Rachmilewitz, William Breuer, Z. Ioav Cabantchik, Diedra M. Wrighting, Nancy C. Andrews, Maria de Sousa, Patricia J. Giardina, Robert W. Grady and Stefano Rivella. "Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin". In press: Blood.

Michel Sadelain, Farid Boulad, Renzo Galanello, Patricia Giardina, Franco Locatelli, Aurelio Maggio, Stefano Rivella, Isabelle Riviere, John Tisdale. "Therapeutic Options for Patients with Severe beta-Thalassemia: The Need for Globin Gene Therapy" Human Gene Therapy, 2006 Dec 11.

\*\*Weizer-Stern O, Adamsky K, Amariglio N, Levin C, Koren A, Breuer W, Rachmilewitz E, Breda L, Rivella S, Cabantchik ZI, Rechavi G.

## L'ASSORBIMENTO DI FERRO DALLA DIETA

Downregulation of hepcidin and haemojuvelin expression in the hepatocyte cell-line HepG2 induced by thalassaemic sera. Br J Haematol. 2006 Oct;135(1):129-38.

\*\*Breda L., Gardenghi S., Guy E., Rachmilewitz E.A., Weizer-Stern O., Adamsky K., Amariglio N., Rechavi G., Giardina P.J., Grady R.W., Rivella S. "Exploring the Role of Hepcidin, an Antimicrobial and Iron Regulator Peptide, in Increased Iron Absorption in Beta-Thalassemia". Annals New York Academy of Science . 2005 Nov;1054:417-22

\*\*Orly Weizer-Stern, Konstantin Adamsky, Ninette Amariglio, Eliezer Rachmilewitz, Laura Breda, Stefano Rivella and Gideon Rechavi "mRNA expression of iron regulatory genes in beta-thalassemia intermedia and beta-thalassemia major mouse models". American journal of Hematology. Am J Hematol. 2006 Jul; 81(7): 479-83.

Rachmilewitz E., Breda L., Weizer-Stern Orly, Adamsky Konstantin, Amariglio N., Rechavi G., Rivella S. and Cabantchik I. "The role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants?" Ann. N.Y. Acad. Sci.: Cooley's Anemia Annals 2005 Nov; 1054: 1054:118-123.

Michel Sadelain, Leszek Lisowski, Selda Samakoglu, Stefano Rivella, Chad May and Isabelle Riviere.

"Progress toward the genetic treatment of the beta-thalassemias" (Ann. N.Y. Acad. Sci.: Cooley's Anemia Annals 2005 Nov;1054:417-22

Adamsky K, Weizer O, Amariglio N, Breda L, Harmelin A, Rivella S, Rachmilewitz E, Rechavi G. "Decreased hepcidin mRNA expression in thalassaemic mice". Br J Haematol. 2004 Jan; 124(1): 123-4.

Stefano Rivella, PhD  
Assistant Professor in Genetic Medicine  
Director, Jaffe Genetics Laboratory  
Weill Medical College of Cornell University  
Department of Pediatric Hematology-Oncology  
515E 71st street, S725, box 284  
New York, NY 10021  
Phone: 212-746 4941  
Fax: 212- 746 8423  
[str2010@med.cornell.edu](mailto:str2010@med.cornell.edu)

La scoperta apre prospettive per la cura anche delle altre anemie  
Svelato uno dei «segreti» della talassemia



## Un'equipe guidata da un ricercatore italiano ha chiarito il motivo per cui in questa malattia c'è un accumulo di ferro nell'organismo

Stefano Rivella

**NEW YORK** – La beta-talassemia, una delle malattie del sangue più complesse e diffuse in Africa, nel Sud Est asiatico e nel bacino del Mediterraneo, che in Italia colpisce circa 5 mila persone, rivela in questi giorni uno dei suoi molti segreti. Un gruppo di ricercatori del Weill Medical College della Cornell University, sotto la direzione del dottor Stefano Rivella, uno scienziato di Torino che dopo gli studi a Pavia si è trasferito negli Stati Uniti, ha individuato il meccanismo genetico che causa il sovraccarico di ferro nei pazienti affetti da questa malattia, nota anche con il nome di anemia mediterranea.

EX - N. 4 maggio 2007 - 17

**TRASFUSIONI**- Nella sua forma più severa - la beta-talassemia major - la terapia trasfusionale ripetuta è indispensabile per prolungare la sopravvivenza. Una delle complicazioni più serie di questa affezione cronica è l'accumulo di ferro in organi come il fegato, il cuore e le ghiandole endocrine, che può causare cirrosi epatica, cancro, collasso cardiaco, diabete, osteoporosi e danni alla crescita. Per queste ragioni il paziente dev'essere sottoposto di continuo a terapie di chelazione del ferro per eliminarne la presenza in eccesso dall'organismo. «Si era sempre creduto – spiega il dottor Rivella – che il sovraccarico di ferro che si riscontra nella beta-talassemia fosse dovuto solo alle trasfusioni. Ma da alcuni anni gli esperti avevano cominciato a notare che perfino i pazienti con beta-talassemia intermedia non sottoposti a trasfusioni presentavano elevati livelli di ferro dovuti ad un aumento di 3-4 volte dell'assunzione attraverso l'intestino». L'eccessivo accumulo di ferro doveva quindi risalire anche ad altre cause. Quali?

**ASSORBIMENTO AUMENTATO** -Una delle novità di questa ricerca è la scoperta che l'assorbimento del ferro è regolato da tre fattori: il livello di anemia, la quantità di ferro già presente nell'organismo e la quantità di epcidina e ferroportina. Queste due proteine agiscono rispettivamente come «sensore» dei livelli di ferro e di «trasportatore» delle molecole di questa sostanza attraverso l'intestino. «Abbiamo notato», precisa Rivella, «che nelle talassemie i geni che controllano le due proteine epcidina e ferroportina sono sbilanciati. Di conseguenza, il corpo consente un eccessivo ingresso di ferro attraverso l'intestino, fino a raggiungere livelli patologici». Allo studio, oltre a ricercatori del Children's Hospital, della Harvard Medical School di Boston e delle università di Oporto e Tel Aviv, hanno partecipato anche le dottoresse Sara Gardenghi, Laura Breda e Maria Franca Marongiu. «Ovviamente – aggiunge Sara Gardenghi, borsista al Weill Medical College grazie a un finanziamento dell'Associazione Veneta per la Lotta alla Talassemia di Rovigo - esistono ragioni legate alla stessa malattia che incoraggiano l'assunzione eccessiva di ferro». Nei topi da laboratorio normali, resi anemici in maniera transitoria, la quantità di epcidina diminuisce, perché il ferro è richiesto dall'organismo per produrre i globuli rossi mancanti. Se nei topi invece si inietta del ferro, il livello di epcidina sale, allo scopo di prevenire un accumulo di ferro eccessivo. Nei casi di talassemia tutto questo delicato equilibrio è invece sconvolto e l'anemia coesiste con il sovraccarico di ferro. Come mai?

**CURA SPERIMENTALE** - Per chiarire il mistero, i ricercatori hanno deciso di misurare il sovraccarico di ferro in topi geneticamente modificati per riprodurre i vari livelli di beta-talassemia e il dottor Rivella ha addirittura «inventato» il primo esemplare di topo affetto dalla beta-talassemia major. Allo scopo di riprodurre il più possibile le condizioni dei pazienti umani, la dottoressa Gardenghi ha inoltre effettuato per mesi trasfusioni su topi affetti da talassemia, migliorando l'anemia e studiando i corrispondenti livelli di epcidina e ferroportina e il sovraccarico di ferro in tali condizioni. La novità più importante di questa scoperta è la possibilità di tenere l'assorbimento di ferro sotto controllo regolando il livello di epcidina nel sangue. Da qui, in un secondo momento, si spera di arrivare allo sviluppo di terapie per il controllo dell'assorbimento e l'accumulazione del ferro non soltanto nella talassemia ma anche in altre forme di anemia.

**Renzo Cianfanelli**  
15 febbraio 2007