

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*Ciclo XXIII***

Relazione 1° anno

TITOLO

**Maturazione e differenziamento megacariocitario in
cellule staminali ematopoietiche:
analisi dell'espressione dei recettori degli
endocannabinoidi**

Candidato: Bagarotti Alessandra

Tutor: Professoressa Fabiola Sinigaglia

**Maturazione e differenziamento megacariocitario in cellule staminali
ematopoietiche:
analisi dell'espressione dei recettori degli endocannabinoidi.**

RIASSUNTO	5
INTRODUZIONE	6
LA MEGACARIOCITOPOIESI	6
REGOLAZIONE DELLA MEGACARIOCITOPOIESI.....	8
PRODUZIONE E RILASCIO DELLE PIASTRINE	11
GLI ENDOCANNABINOIDI.....	13
GLI ENDOCANNABINOIDI: sintesi e degradazione	14
GLI ENDOCANNABINOIDI: i recettori	16
SCOPO DEL LAVORO	18
METODI.....	20
Isolamento di cellule staminali ematopoietiche murine	20
Preparazione di piastrine murine	20
Preparazione di lisati cellulari totali e analisi della fosforilazione proteica	21
Analisi dell'espressione genica di CB1 e CB2 mediante RT-PCR	21
RISULTATI.....	23
DISCUSSIONE.....	26
BIBLIOGRAFIA	28

Analisi dell'attività antiaggregante di biosurfattanti

INTRODUZIONE	34
I BIOSURFATTANTI.....	34
I BIOSURFATTANTI: LE APPLICAZIONI.....	35
SCOPO DEL LAVORO	37
METODI.....	38
I biosurfattanti.....	38
Preparazione delle piastrine: gel-filtrazione	38
Preparazione di plasma ricco in piastrine (platelet rich plasma "PRP")	38
Analisi della aggregazione piastrinica.....	39
RISULTATI.....	40
DISCUSSIONE.....	44
BIBLIOGRAFIA	45

SEZIONE 1
RISULTATI SCIENTIFICI

RIASSUNTO

I megacariociti, cellule del sangue altamente differenziate che originano da cellule staminali ematopoietiche (HSC) pluripotenti e CD34 positive, rappresentano le cellule deputate alla produzione e rilascio di piastrine. Poiché sono tra le più rare cellule del sistema ematopoietico, costituiscono infatti meno dell'1% delle cellule presenti nel midollo osseo (Levine, 1980), a lungo si è tentato di sviluppare sistemi *ex vivo* per la loro espansione e differenziamento, sia per scopi terapeutici che di ricerca.

Il processo differenziativo dei megacariociti, chiamato megacariocitopoiesi, si compone di tre fasi: formazione delle cellule progenitrici eritromegacariocitiche, maturazione dei megacariociti e produzione di piastrine (Deutsch and Tomer, 2006; Kirito and Kaushansky, 2006).

Recenti studi riportati in letteratura, dimostrano che recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) svolgono un ruolo chiave nel guidare il differenziamento cellulare (Hebert et Bouvier 1998), in particolare i due principali recettori cannabinici, i GPCRs CB1 e CB2, sono implicati nei meccanismi che regolano la proliferazione e/o il differenziamento di cellule sia della linea mieloide che linfoide (Valk 1997, Jiang 2007, Randall 2007).

Pochi dati sono al momento disponibili riguardo il corredo recettoriale delle cellule ematopoietiche della linea megacariocito/eritroide.

E' in questo contesto che si inserisce il mio lavoro, nato con l'intento di valutare il ruolo degli endocannabinoidi nella modulazione del processo megacariocitopoietico.

INTRODUZIONE

LA MEGACARIOCITOPOIESI

I megacariociti sono rare cellule mieloidi che risiedono principalmente nel midollo osseo (Ogawa et al., 1993), ma anche nel polmone e nel sangue periferico. Durante il primo sviluppo, prima che le cavità del midollo siano sufficientemente grandi per supportare la differenziazione delle cellule del sangue, la megacariopoiesi avviene nel sacco vitellino e successivamente nel fegato fetale (Sunita et al., 2005).

Il processo differenziativo del megacariocita inizia quando la cellula staminale emopoietica viene commissionata verso la linea mieloide, e continua con il successivo stadio di maturazione da BFU-MK (megacaryocyte burst-forming unit) a CFU-MK (megacaryocyte colony-forming unit). La maturazione di queste cellule, porta poi alla formazione dei megacarioblasti e l'intero processo culmina con la formazione dei megacariociti maturi e il successivo rilascio di piastrine.

Nell'uomo il processo di megacariocitopoiesi produce ogni giorno 10^{11} piastrine; a seconda delle necessità la produzione può essere aumentata anche di 10 volte (Kaushansky 2005a).

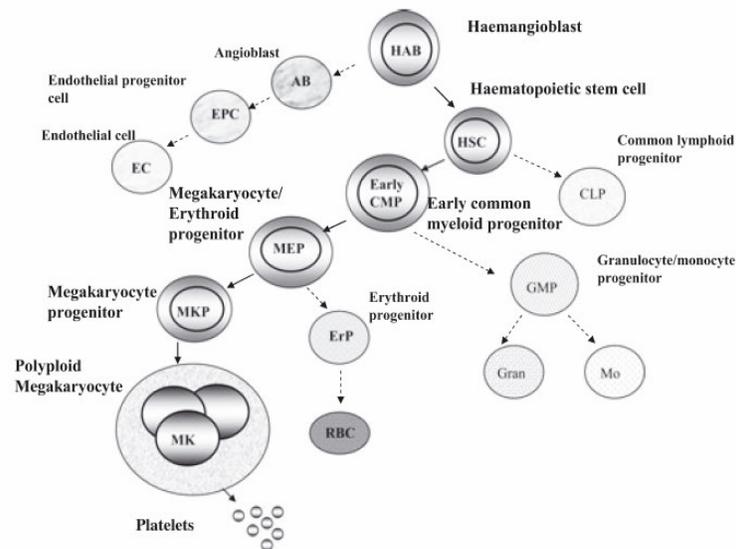


FIG.1 SCHEMA DEL DIFFERENZIAMENTO EMATOPOIETICO: Lo sviluppo delle cellule del sangue procede da una cellula staminale ematopoietica (HSC), che può replicarsi o differenziare in cellule progenitrici di varie filiere: un progenitore linfocita comune (CLP) o un progenitore mieloide comune (CMP). Queste cellule poi originano progenitori più differenziati, compresi quelli indirizzati alle filiere dei megacariociti e cellule eritroidi (MEPs). 6

I megacariociti, per poter sintetizzare le piastrine, devono modificare il loro citoplasma: prima che il megacariocita possa rilasciare i trombociti, deve ingrossarsi considerabilmente fino a raggiungere un diametro approssimativo di 100 μm ; contemporaneamente deve aumentare anche il numero di ribosomi (che saranno in seguito necessari per la sintesi di proteine piastrino-specifiche) (Long *et al.*, 1982). L'ingrossamento della cellula è mediato da cicli ripetuti di endomitosi, un processo di amplificazione del DNA (Odell *et al.*, 1968, Ebbe *et al.*, 1976, Ebbe *et al.*, 1965, Ravid *et al.*, 2002), indotto principalmente dalla Trombopoietina (TPO). Durante l'endomitosi, parallelamente alla maturazione citoplasmatica, vengono replicati i cromosomi e si rompe l'involucro nucleare; sebbene ci sia un assemblaggio del fuso mitotico, il normale ciclo cellulare viene interrotto durante l'anafase: i fusi non si separano e sia la telofase che la citocinesi non vengono portate a termine. Il nuovo nucleo generato da questo processo risulta essere poliploide, multilobato e con un contenuto di DNA variabile da 4N fino a 128N (Nagata *et al.*, 1997, Odell *et al.*, 1970).

Oltre alla replicazione del DNA, elementi contraddistintivi della maturazione del megacariocita sono lo sviluppo di un complesso sistema membranario e la formazione di granuli ed organelli. Di particolare importanza è la formazione di una grossa rete di interconnessioni membranarie, chiamata sistema di demarcazione delle membrane (DMS), la cui funzione è stata a lungo dibattuta. Inizialmente si pensava servisse per dividere il citoplasma del megacariocita in piccole aree in cui le piastrine potevano essere facilmente assemblate e poi rilasciate (Yamada *et al.*, 1957). Attualmente si pensa invece che il DMS, che è in continuità con la membrana plasmatica (Behnke *et al.*, 1968, Nakao *et al.*, 1968), possa servire come riserva di materiale di membrana necessario per la formazione di propiastrine. Durante la maturazione del megacariocita, si formano anche una fitta rete tubulare (Gerrard *et al.*, 1976) e il sistema canalicolare aperto (OCS), una rete di canali per il rilascio dei granuli. Specifiche proteine piastriniche, come i recettori del fattore di Von Willebrand (vWF) e del fibrinogeno, sono sintetizzate ed indirizzate sulla superficie del megacariocita; altre, come il vWF, sono impacchettate in granuli secretori (α -granuli) (Henijnen *et al.*, 1998). Altre proteine ancora, come il fibrinogeno, sono invece internalizzate dal plasma tramite processi di endocitosi e/o pinocitosi, e selettivamente convogliate in specifici granuli piastrinici (Henijnen *et al.*, 1998, Handagama *et al.*, 1987). Durante la

maturazione megacariocitaria vengono assemblati anche i mitocondri e i granuli densi che, come gli α -granuli, derivano dal complesso del Golgi. Grazie all'intero processo di maturazione il megacariocita è dotato di tutti gli elementi necessari per la biogenesi delle piastrine.

REGOLAZIONE DELLA MEGACARIOCITOPOIESI

Il processo della megacariocitopoiesi e produzione delle piastrine avviene nel midollo osseo, in un microambiente in cui chemochine, citochine ed interazioni adesive giocano un ruolo chiave (Acevilla et al., 2004). I meccanismi che regolano la megacariocitopoiesi operano a livello della proliferazione e differenziamento dei megacariociti e del rilascio di piastrine (Gewirtz 1995, Kaushansky 2003).

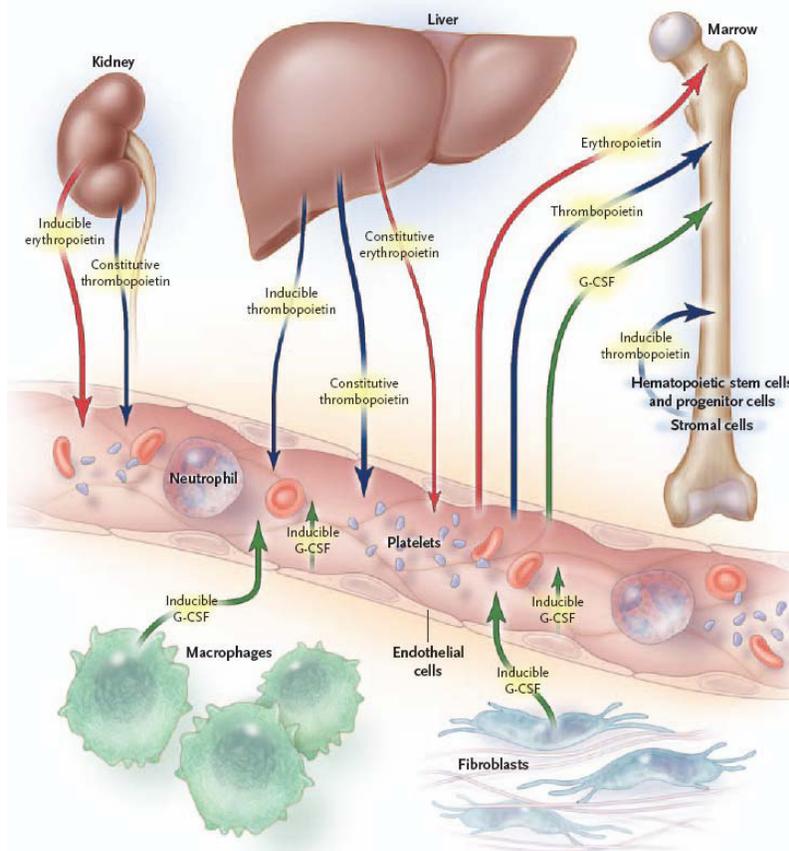


FIG. 2 PRODUZIONE DEI FATTORI DI CRESCITA EMATOPOIETICI: la produzione di fattori di crescita dai vari tessuti e cellule (freccie) è sia costitutiva che inducibile ed è soggetta al consumo periferico. Il G-CSF (freccie verdi) è soprattutto inducibile in tessuti dai fibroblasti e macrofagi e da cellule endoteliali grazie all'azione combinata di mediatori dell'infiammazione (IL-1, IL-6, e TNF α). La TPO (freccie blu) è prodotta costitutivamente da fegato (approssimativamente il 50 % del livello basale di TPO) e rene. Sia G-CSF che TPO sono rimossi dalla circolazione da cellule mature (come neutrofili e piastrine) che esprimono sulla superficie gli specifici recettori. Le frecce indicano la produzione e la secrezione dei fattori di crescita ematopoietici.

La TPO (trombopoietina), anche conosciuta come ligando di c-Mpl, oltre a giocare un ruolo centrale nella sopravvivenza e proliferazione delle cellule staminali emopoietiche (Kaushansky. 2005b, 2006), è il principale regolatore della trombopoiesi. Nell'uomo viene prodotta costitutivamente dal fegato ed i suoi livelli circolanti sono regolati dal legame al recettore c-Mpl presente su piastrine circolanti e megacariociti: il legame della TPO al recettore ne comporta infatti l'internalizzazione. La via di segnalazione intracellulare iniziata dall'omodimerizzazione del recettore, prosegue con il reclutamento di chinasi della famiglia JAK e successive fasi di fosforilazione. L'azione fisiologica della TPO, che non sembrerebbe influenzare il rilascio di piastrine, si esplica inducendo l'aumento delle dimensioni cellulari, la ploidia ed il processo di formazione delle propiastriane (Kaushansky 2005). E' noto che la TPO agisce anche in sinergia con altri fattori, incluse l'interleuchina 3 (IL-3), IL-6 e l'IL-11, sebbene queste ultime non siano essenziali per la maturazione dei megacariociti (Kaushansky *et al.*, 2002). Scoperta nel 1994 tre gruppi di ricerca indipendenti (Bartley *et al.*, 1994, Lok and Foster, 1994; Sohma *et al.*, 1994), la TPO viene attualmente utilizzata per espandere *in vitro* cellule staminali emopoietiche e progenitori dei megacariociti (Kaushansky 2005b Ivanovic *et al.*, 2006).

Sebbene la trombopoietina sia il principale regolatore fisiologico della megacariocitopoiesi, non è l'unico: altri fattori di crescita pleiotropici stimolano la crescita dei megacariociti da soli o in combinazione con la TPO. Tra questi: fattore stimolante formazione di colonie granulo-monocitiche (GM-CSF), IL-3, IL-6, IL-11, fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) ed eritropoietina (EPO) (Tomer *et al.*, 1987, 1988; Broudy & Kaushansky, 1995; Deutsch *et al.*, 1995; Kaushansky *et al.*, 1995; Bruno *et al.*, 2003).

Esistono anche fattori che inibiscono la megacariocitopoiesi, tra cui: il fattore di crescita trasformante- β 1 (Kuter *et al.*, 1992), il fattore piastrinico 4 e l'interleuchina 4 (Han *et al.*, 1991; Zauli & Catani, 1995).

Recenti studi mostrano che gli inibitori delle Src chinasi, quando utilizzati *in vitro*, si comportano sia come regolatori negativi della proliferazione megacariocitaria, che come induttori del loro differenziamento (Gandhi *et al.*, 2005; Lannutti *et al.*, 2005).

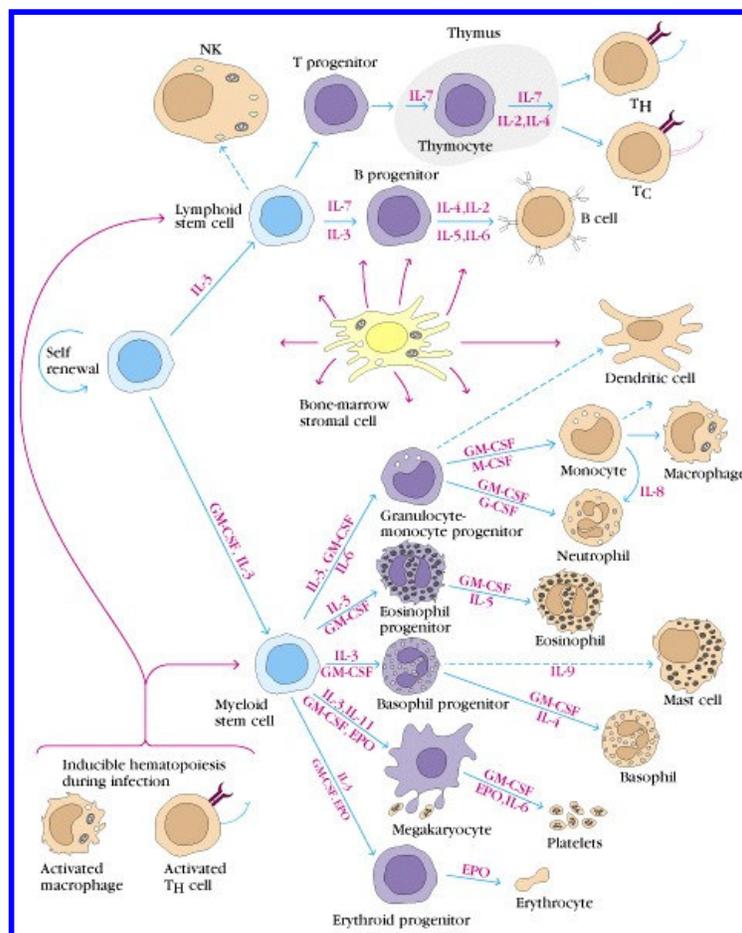


FIG. 3 FATTORI COINVOLTI NEL DIFFERENZIAMENTO EMATOPOIETICO: Lo sviluppo di differenti tipi cellulari a partire dalla cellula staminale mieloide, richiede l'azione combinata di più citochine e fattori di crescita. La produzione di piastrine, in particolare, è regolata da trombopoietina (TPO), eritropoietina (EPO), Interleuchina 6 (IL-6), IL-11, IL-3, fattore stimolante formazione di colonie granulo-monocitiche (GM-CSF).

Lo sviluppo di cellule del sangue mature a partire dalla cellula staminale emopoietica (HSCs), comporta anche un progressivo restringimento del potenziale differenziativo (perdita della staminalità) e modulazione d'espressione di geni linea-specifici. Perché avvenga una corretta megacariocitopoiesi è quindi essenziale l'azione combinata di più fattori di trascrizione che attivino in modo specifico i geni dei precursori megacariocitari e/o inibiscano l'espressione dei geni che supportano invece il differenziamento in altri tipi cellulari. Molti geni megacariocita specifici, sono co-regolati dai seguenti fattori: GATA, FOG (friend of GATA), AML/RUNX1 (acute myeloid leukaemia / runt-related TF1), FLI1, MYB e NF-E2 (Schulze et al., 2004).

PRODUZIONE E RILASCIO DELLE PIASTRINE

L'assemblaggio ed il rilascio delle piastrine sono ad oggi considerati eventi accoppiati, che seguono la formazione delle propiastriane (*Hartwig et al., 2003*).

La sintesi dei trombociti avviene principalmente in megacariociti altamente polipoidi e completamente differenziati: nell'arco di poche ore la maggior parte del citoplasma viene lentamente trasformato in protrusioni filamentari (100-500 μm di lunghezza; 2-4 μm di diametro), chiamate propiastriane (*Radley et al., 1980, Choi et al., 1995*). Il processo inizia ad un polo del megacariocita grazie ad una riorganizzazione citoscheletrica a carico dei filamenti di actina e prosegue con una fase di allungamento dei microtubuli (*Italiano et al., 1999*).

Attualmente esistono due modelli di trombopoiesi, che non necessariamente sono mutuamente esclusivi (*Deutsch and Tomer 2006*). Secondo il primo modello i megacariociti maturi, quando coltivati in contatto con matrice extracellulare del sottoendotelio, sono stimolati a produrre piastrine con una frammentazione esplosiva dell'intero citoplasma (*Caine et al., 1986*). Questa teoria, che ad oggi sembra essere sorpassata, era stata confermata da studi di microscopia a contrasto di fase *in vivo* ed *in vitro* (*Caine et al., 1986; Eldor et al., 1986*). Il secondo modello, ad oggi quello più accreditato, propone invece che sebbene lungo le protrusioni citoplasmatiche si formino rigonfiamenti con struttura e dimensioni simili a quelle piastriniche, il trombocita maturo sia presente esclusivamente alle estremità delle protrusioni (*Patel et al., 2005*). Solamente in questa sede infatti, le piastrine sono rifornite degli specifici granuli ed organelli (migrati dal corpo cellulare all'estremità delle estroflessioni grazie all'azione combinata di dineina e chinesina). Recenti video realizzati in microscopia mostrano, a conferma di questa teoria, una natura dinamica delle propiastriane: la loro formazione è accompagnata da un alternarsi di fenomeni quali estensione, retrazione, ricurvamenti e ramificazioni; queste ultime in particolare (*Italiano et al., 1999*), rappresenterebbero un elegante meccanismo per amplificare il numero delle estremità produttive. Sempre secondo questa teoria i megacariociti maturi, indotti dal fattore chemotattico SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) e in presenza di FGF-4 (fibroblast growth factor-4), migrerebbero dalla nicchia midollare verso le cellule endoteliali dei sinusoidi. Le propiastriane si comporterebbero

quindi da linee d'assemblaggio per la produzione di trombociti: estendendosi nei sinusoidi midollari, in seguito a distacco mediato dal contatto con il torrente circolatorio, rilascerebbero le singole piastrine direttamente nel flusso sanguigno (Zucker-Franklin and Petursson, 1984; Mori et al., 1993).

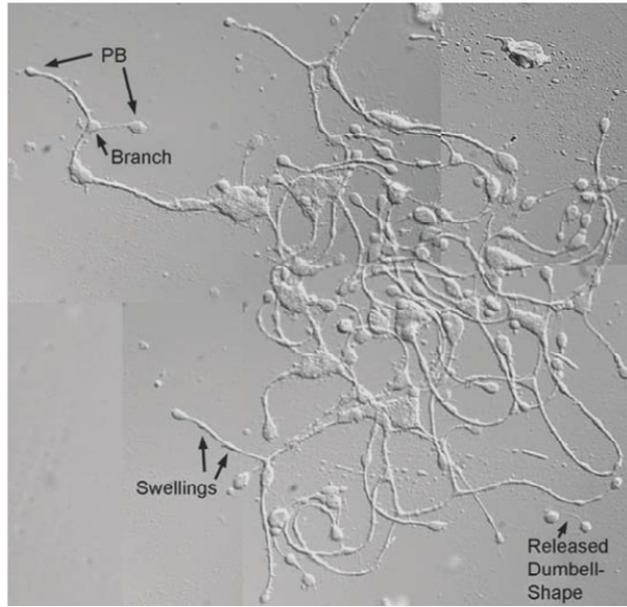


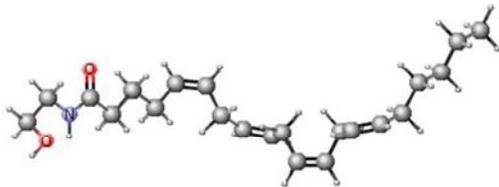
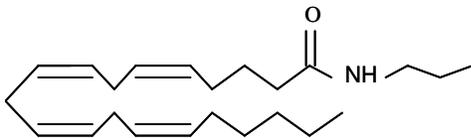
FIG. 4 FORMAZIONE DI PROPIASTRINE: nell'arco di poche ore, il citoplasma del megacariocita viene convertito in protrusioni filamentari chiamate propiastrine. Dall'immagine è possibile osservare lungo le estroflessioni la presenza di rigonfiamenti (che conferiscono alla propiastrina l'aspetto di una collana a filo di perle) e biforcazioni.

Dati riportati in letteratura, (De Botton et al., 2002), suggeriscono che alla sintesi dei trombociti si accompagnino fenomeni di attivazione delle caspasi: mentre nelle prime fasi della megacariocitopoiesi è stata riscontrata la presenza di proteine antiapoptotiche (Bcl-2 e Bcl-XL), nei megacariociti maturi sono maggiormente presenti fattori proapoptotici (caspasi 3, 12, 9), probabilmente necessari alla frammentazione citoplasmatica ed eliminazione del nucleo multilobato senescente.

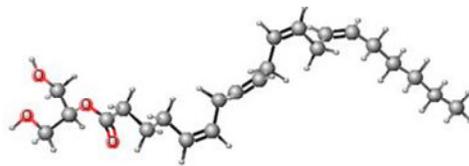
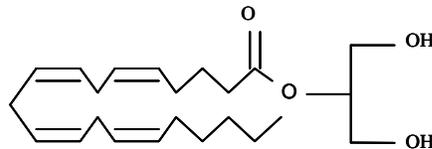
GLI ENDOCANNABINOIDI

Gli endocannabinoidi sono una nuova classe di mediatori lipidici endogeni che mimano alcuni degli effetti psicotropici, ipnotici ed analgesici dei costituenti naturali della *Cannabis Sativa*, denominati cannabinoidi; comprendono ammidi, esteri ed eteri di acidi grassi poliinsaturi a catena lunga. L'anandamide AEA (N-arachidonoiletanolammide), ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), sono i maggiori esponenti.

ANANDAMIDE



2-ARACHIDONOILGLICEROLO



La loro azione si esplica mediante il legame a specifici recettori, associati a proteine G eterotrimeriche (G Protein-coupled Receptors o GPCRs), di cui si conoscono due isoforme: il recettore CB1 (*Matsuda, 1997*), quasi esclusivamente localizzato nel sistema nervoso, ed il recettore CB2 (*Munro et al., 1993*), localizzato prevalentemente nei tessuti periferici. L'AEA e il 2-AG sono in grado di mimare gli effetti tipici della marijuana, proprio perché il principio attivo di tale droga, il D⁹-tetraidrocannabinolo (THC), esplica la sua azione attraverso il legame agli stessi recettori (*Devane et al., 1992; Sugiura et al., 1998; Mechoulam et al., 1995*).

GLI ENDOCANNABINOIDI: sintesi e degradazione

Il coinvolgimento degli endocannabinoidi nella modulazione di funzioni fisiologiche sia a livello del sistema nervoso che in tessuti periferici, è oggi confermato dalla scoperta di specifici meccanismi biosintetici e degradativi (*Di Marzo et al., 1998-a; Di Marzo 1998-b*). Sia l'anandamide che il 2-AG vengono prodotti a partire da precursori biosintetici fosfolipidici e inattivati mediante ricaptazione da parte delle cellule e successive reazioni di idrolisi e/o esterificazione.

L'anandamide viene prodotta dall'idrolisi dell'*N*-arachidonil-fosfatidiletanolamina (NArPE), ad opera di una fosfolipasi D (*Di Marzo et al., 1994*) appartenente alla famiglia delle zinco-metalloproteasi. Il NArPE, a sua volta, deriva dal trasferimento del gruppo acile (l'acido arachidonico) dalla posizione sn-1 di un fosfolipide di membrana (fosfatidilcolina), alla funzione amminica libera della fosfatidiletanolamina, ad opera di una *N*-acyltransferasi (NAT) che richiede per la sua azione la presenza di ioni calcio e cAMP (*Di Marzo et al., 1996*).

Il 2-AG viene invece prodotto dall'idrolisi enzimatica di diacilgliceroli contenenti 2-arachidonioile, ad opera dell'enzima sn-1 diacilglicerolo lipasi (sn-1 DAGL) (*Di Marzo et al., 1996; Bisogno et al., 1997; Stella et al., 1997*). I diacilgliceroli utilizzati come precursori biosintetici del 2-AG possono essere ottenuti, a loro volta, dall'idrolisi sia del fosfatidilinositolo (PI), catalizzata dalla fosfolipasi di tipo C PI-selettiva, sia dell'acido fosfatidico (PA) (*Prescott et al., 1983*), catalizzata da una specifica fosfolipasi.

Questi meccanismi biosintetici differenziano gli endocannabinoidi da altri neuromodulatori: l'anandamide e il 2-AG vengono infatti sintetizzati a partire dai loro precursori fosfolipidici solo quando la cellula è stimolata, per esempio, dall'ingresso di ioni calcio. Quando sintetizzati, gli endocannabinoidi si legano ai recettori CB presenti su cellule limitrofe o sulla stessa cellula che li ha prodotti, comportandosi come mediatori paracrini o autocrini. La loro natura chimica estremamente poco idrosolubile, ne impedisce infatti la diffusione nella matrice extracellulare o nel sangue.

L'azione biologica degli endocannabinoidi viene interrotta mediante meccanismi differenti:

a) ricaptazione da parte delle cellule che, nel caso dell'anandamide, viene facilitata dal trasportatore di membrana AMT;

- b) riesterificazione dei prodotti dell'idrolisi in fosfolipidi di membrana;
- c) idrolisi enzimatica (Di Marzo *et al.*, 1994; Di Marzo *et al.*, 1996; Cravatt *et al.*, 1996).

In particolare l'idrolisi dell'anandamide è catalizzata da un enzima che è stato caratterizzato e denominato "idrolasi dell'amide degli acidi grassi" (FAAH), una serina-idrolasi di membrana contenente una sequenza ricca in prolina riconosciuta da molecole contenenti il dominio SH3 (Src homology 3) (Goparaju *et al.*, 1998). In alcune condizioni FAAH catalizza anche l'idrolisi del 2-AG (Cravatte *et al.*, 1996), per il quale, comunque, esistono anche altre idrolasi più selettive (MAGL).

Il FAAH idrolizza l'AEA in acido arachidonico ed etanolamina; il 2-AG per azione della lipasi dei monoacilgliceridi (MAGL), viene invece scisso in acido arachidonico e glicerolo. MAGL è anch'essa una serina idrolasi, presente sia nelle membrane che nelle frazioni citosoliche.

GLI ENDOCANNABINOIDI: i recettori

I due principali tipi di recettori dei cannabinoidi, CB1 e CB2, appartengono alla super famiglia di recettori associati a proteine-G (G Protein-coupled Receptors o GPCRs), e come tali presentano un segmento N-terminale nella matrice extracellulare, sette domini ad alfa elica trans-membrana, tre “anse” extracellulari e tre citosoliche contenenti anche la porzione C-terminale. CB1 e CB2 sono in particolare associati a proteine di tipo Gi che mediano diversi effetti intracellulari tra cui: l’inibizione della adenilato ciclasi, l’attivazione di proteine chinasi e, il solo CB1, la regolazione dei canali di calcio e potassio (Howlett, 2002).

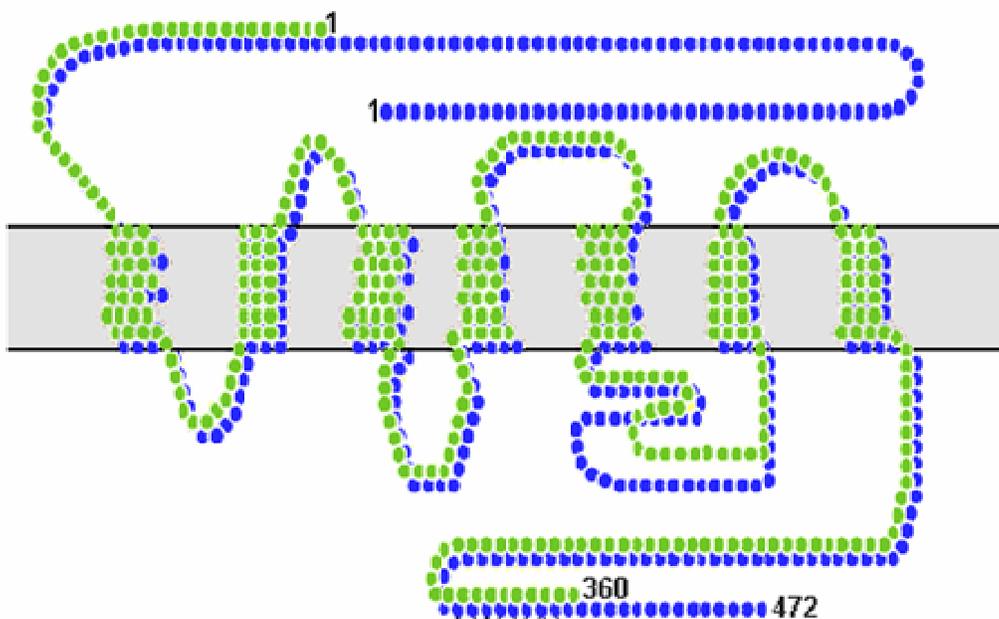


FIG. 5 Struttura dei recettori CB1 (blu) e CB2 (verde)

L’AEA e il 2-AG si comportano rispettivamente come agonista parziale e totale dei recettori CB, ed il loro sito di legame è localizzato nelle porzioni transmembrana (Xie *et al.*, 2003).

CB1, primo recettore dei cannabinoidi ad essere stato clonato, è localizzato principalmente nei neuroni centrali, in quelli periferici e nelle cellule gliali, è espresso

anche nel sistema riproduttivo (sia maschile che femminile) e nella microcircolazione (*Mukhopadhyay et al., 2002*).

Per molto tempo si è pensato che il CB2 fosse localizzato esclusivamente nelle cellule T del sistema immunitario, con la più alta densità a livello della milza; studi hanno invece dimostrato la sua presenza anche nei linfociti B, nei monociti, nei neutrofilii polimorfonucleati e nelle cellule della microglia (*Piomelli, 2003*).

Studi farmacologici hanno dimostrato l'esistenza di altri bersagli degli endocannabinoidi: il recettore vanilloide di tipo 1 (VR1) e almeno due recettori non CB1/CB2. Questi ultimi si localizzano nelle terminazioni assoniche ma la loro struttura e funzione rimangono da definire (*Kunos, 2000*).

VR1 appartiene alla famiglia dei canali voltaggio-dipendenti che rilasciano calcio in modo transiente. E' un recettore costituito da sei domini transmembrana ed è localizzato nel cervello e nei neuroni sensitivi, dove risponde al calore aprendo canali cationici che promuovono l'ingresso di calcio e il rilascio di neuromediatrici; anche in questo caso il sito di legame dell'AEA sul recettore è intracellulare. L'attivazione di VR1 può essere mediata anche dalla capsaicina, componente "pungente" del peperoncino, che comporta anche una immediata desensitizzazione (*Jung et al., 2002*). La maggior parte dei recettori VR1 sembra colocalizzare con i CB1 sui neuroni nocicettivi; l'AEA, a seconda del recettore che lega, può così inibire (via CB1) o indurre (via VR1) risposte nocicettive. In particolari condizioni tipiche dell'infiammazione, quali pH acido o presenza di ossido nitrico, quando la PKA e PKC sono attivate, l'AEA è più attivo su VR1 che sui recettori CB1 e CB2 e determina una diversa percezione del dolore, a seconda ci sia anche desensitizzazione (*Di Marzo et al., 2002*).

SCOPO DEL LAVORO

Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato un nuovo ruolo fisiologico per gli endocannabinoidi quali molecole coinvolte nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare, sia nel sistema nervoso (*Molina-Holgada et al., 2007*) che a livello periferico (*Matias et al., 2006*). Dati recentemente pubblicati in letteratura dimostrano che gli endocannabinoidi sono anche implicati nei meccanismi che regolano proliferazione e/o differenziamento di cellule sia della linea mieloide che linfoide (*Valk et al., 1997; Jiang et al., 2007; Randall et al., 2007*): la iper-espressione del recettore CB2 in precursori mieloidi, per esempio, determina un blocco del differenziamento granulocitico attraverso l'attivazione della via di segnalazione delle MAP chinasi (*Jorda et al., 2003-a; Jorda et al., 2003-b*).

Valk et al. hanno anche dimostrato che l'anandamide, *in vitro*, agendo sui recettori CB2, sinergizza con i fattori che stimolano la formazione delle colonie, con l'interleuchina 3 e con l'eritropoietina stimolando così l'eritropoiesi (*Valk et al., 1997*).

Nonostante il crescente interesse, ancora pochi sono i dati disponibili riguardo al ruolo degli endocannabinoidi durante il differenziamento megacariocitico.

Dalla letteratura è noto che le cellule ematopoietiche staminali, oltre a possedere i recettori per gli endocannabinoidi CB1 e CB2, sono in grado di sintetizzare gli endocannabinoidi (*Jiang et al., 2007*). Inoltre è stato riportato che le piastine esprimono i recettori per gli endocannabinoidi CB1, CB2 (*Randall et al., 2007*) e TRPV1 (*Authi, 2007*). Tuttavia, poco è noto riguardo al corredo recettoriale delle cellule ematopoietiche della linea megacariocito/eritroide, precursori di piastine e globuli rossi

Recentemente è stato dimostrato che cellule ematopoietiche staminali embrionali di topo esprimono i recettori CB1 e CB2 e che entrambi sono funzionali. L'aggiunta dei cannabinoidi aumenta la formazione dei corpi embrionali derivanti da queste cellule indicando che essi, attraverso l'attivazione dei recettori cannabici, inducono il differenziamento ematopoietico di cellule staminali embrionali murine e dei corpi embrionali da esse derivanti (*Jiang et al., 2007*). Questi dati suggeriscono che i recettori cannabici ed i loro ligandi possano essere coinvolti nel mantenimento delle cellule staminali embrionali e che il sistema endocannabinoide sia essenziale per la sopravvivenza e il differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche.

E' in questo contesto che si inserisce il mio lavoro, nato con l'intento di valutare la presenza dei recettori cannabinici sui precursori megacariocitari e l'eventuale modulazione di espressione durante la megacariocitopoiesi. A questo scopo le cellule staminali ematopoietiche murine sono state differenziate in vitro in presenza di opportuno cocktail di citochine e il differenziamento è stato valutato in base all'aumento delle dimensioni. La presenza dei vari recettori per gli endocannabinoidi è stata valutata sia come trascritto tramite RT-PCR, sia come proteina, in esperimenti di Western Blotting.

METODI

Isolamento di cellule staminali ematopoietiche murine

Cellule del midollo osseo sono state prelevate dalle tibie e dai femori di topi Balb/C di 6-8 settimane e raccolte in PBS contenente 2% BSA, 0.38% trisodio citrato e 1 U/ml di DNase. Le cellule mononucleate sono state isolate tramite centrifugazione in gradiente di Ficoll Hypaque (1.084 g/ml, GE HealthCare) per 30min a 400xg. Le cellule mononucleate sono poi state coltivate ad una densità iniziale di 10^6 /mL in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) in presenza di 10 ng/ml di Trombopoietina, 10 ng/ml di Interleuchina-6 e 10 ng/ml di Interleuchina-11, murine (PeproTech). Dopo 5 giorni di coltura la popolazione di megacariociti maturi e poliploidi è stata arricchita sedimentando le cellule per gravità per 1 ora, a 37° C, in provette coniche e poi applicandole su un gradiente discontinuo di 1% -2% - 3% BSA in PBS, pH 7.4 e lasciandole nuovamente sedimentare per gravità (30 minuti a 37° C).

Preparazione di piastrine murine

Il sangue viene prelevato da topi sani Balb/C di 6-8 settimane. Come anticoagulante vengono utilizzati pochi μ L di una soluzione 1:2 di Sodio citrato 3.8% e ACD (130 mM acido citrico, 152 mM Na-citrato e 112 mM D-glucosio). Il volume di sangue aspirato mediante puntura cardiaca, viene portato a circa 1.8 mL (aggiungendo tampone Tyrode - 10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃; pH 7.4). Il plasma ricco di piastrine (PRP) è il surnatante ottenuto da una centrifuga a 179 x g, per 6 minuti, a 30° C. Per aumentare il numero di piastrine disponibili, il pellet di globuli rossi viene risospeso in Tyrode e nuovamente centrifugato, al fine di recuperare quanto più possibile PRP. Il plasma ricco in piastrine viene addizionato di 0,02 U/mL di aspirasi e PGE1 1 μ M; segue una centrifuga a 550 x g, per 5 minuti, a 30° C. Il surnatante ottenuto (plasma povero in piastrine) viene allontanato dal pellet piastrinico che dev'essere invece risospeso in Tyrode. Le cellule vengono contate in camera di Burker e portate alla concentrazione desiderata (tampone Tyrode).

Preparazione di lisati cellulari totali e analisi della fosforilazione proteica

I megacariociti isolati come precedentemente descritto sono stati lisati con RIPA 1X (75 mM NaCl, 50 mM TRIS, 1% Nonidet P40, 0,1% SDS e 0,5% sodio deossicolato), in presenza di inibitori di proteasi. I campioni, dissociati mediante l'aggiunta di SDS-sample buffer (96 mM glicina a pH 8.3; 0,5% DTT; 2% SDS; 10% glicerolo; 12.5 mM TRIS; 0.01% blu di bromofenolo), sono poi stati scaldati a 95° C, per 5 minuti. Successivamente le proteine sono state separate mediante corsa su gel lineare di poliacrilamide, trasferite con Western Blotting su membrana PVDF (polivinildene di fluoruro) e marcate con anticorpi anti-CB1 e anti-CB2.

Analisi dell'espressione genica di CB1 e CB2 mediante RT-PCR

L'RNA presente nei megacariociti è stato estratto con RNAqueous kit (Ambion), seguendo le istruzioni indicate dalla ditta produttrice. Al fine di evitare amplificazione di DNA genomico, è stato eseguito anche un trattamento con DNasi I (Ambion). Dopo aver quantificato l'RNA ottenuto (con fluorimetro Qubit - Invitrogen), 1 µg di RNA /campione è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando RETROscript Kit (Ambion). L'amplificazione, eseguita con GoTaq Master Mix (Promega), prevedeva le seguenti condizioni:

- CB1 : primer forward 5'- GTG CCG AGG GAG CTT CTG - 3'
primer reverse 5'- TTG GAT GCC ATG TCT CCT TT- 3'
prodotto di amplificazione: 204 paia di basi.
- CB2: primer forward 5'-CTG CCT GAT AGG CTG GAA GA- 3'
primer reverse 5'- TCA GAA AGA ATC CGG GTC TG- 3'
prodotto di amplificazione: 244 paia di basi.
- GAPDH (controllo positivo):
primer forward 5'- CTG GCC AAG GTC ATC CAT GA - 3'
primer reverse 5'- AGG GGC CAT CCA CAG TCT T - 3'
prodotto di amplificazione: 78 bp.

La PCR, eseguita in PTC-100 Peltier Thermal Cycler (Celbio), prevedeva il seguente protocollo:

Numero di cicli	Temperatura	Durata
1	94° C	2 minuti
35	94° C	30 secondi
	55° C	30 secondi
	72° C	1 minuto
1	72° C	5 minuti

Aliquote (20 µL) dei prodotti di PCR sono state corse su gel d'agarosio all'1,5%, contenente etidio bromuro.

RISULTATI

Espressione di CB1 e CB2: analisi mediante Immunoblotting

Per valutare la presenza dei recettori degli endocannabinoidi CB1 e CB2, lisati di megacariociti murini sono stati analizzati mediante Immunoblotting. A questo scopo, cellule staminali ematopoietiche murine sono state isolate come precedentemente descritto, e indotte al differenziamento megacariocitico. Al quinto giorno dall'induzione del differenziamento, grazie al significativo aumento di dimensioni, i megacariociti maturi sono stati separati dal resto della popolazione cellulare (indicata come cellule non megacariocitiche -NMs-), tramite sedimentazione. L'immunocolorazione è stata eseguita con specifici anticorpi commerciali: anti-CB1 (Santa Cruz) e anti-CB2 (Cayman chemical). Com'è possibile osservare in figura il solo CB2 (pannello B) sembra essere presente. La presenza del recettore CB1 invece, non è rilevabile (pannello A).

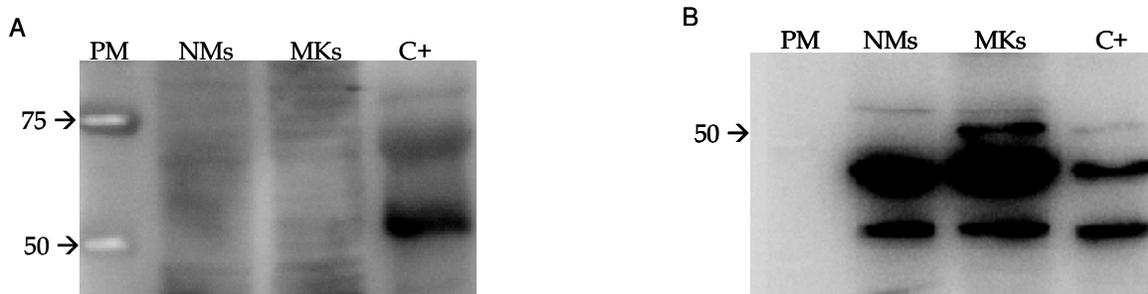


FIG. 6 ESPRESSIONE DEI RECETTORI CANNABICI IN MEGACARIOCITI MURINI: in figura sono riportate le diverse espressioni di CB1 (pannello A) e CB2 (pannello B).. MKs = cellule ematopoietiche differenziate in megacariociti; NMs = cellule non megacariocitiche. C+ = controllo positivo (lisato di sottocutaneo per CB1; cellule Jurkat per CB2). Com'è possibile osservare, il solo CB2 sembrerebbe essere presente nei campioni considerati.

L'espressione dei recettori degli endocannabinoidi CB1 e CB2, è stata valutata anche in piastrine murine. Campioni di piastrine preparate come precedentemente descritto nella sezione materiali e metodi, sono stati lisati e poi dissociati. Le analisi in Immunoblotting hanno mostrato che, come visibile dalla figura, l'espressione dei recettori cannabinici è molto simile a quella ottenuta in campioni di megacariociti differenziati: il CB2 sembra essere presente; CB1 invece non viene rilevato.

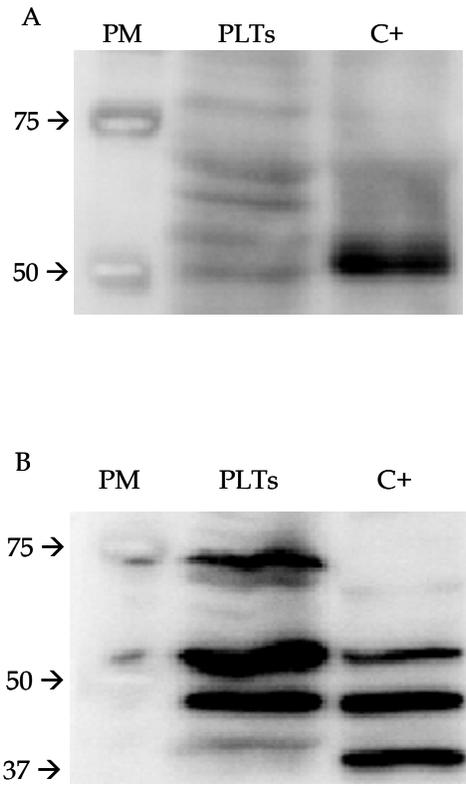


FIG. 7 ESPRESSIONE DEI RECETTORI DEGLI ENDOCANNABINOIDI IN PIASTRINE MURINE: in figura è riportata l'espressione di CB1 (pannello A) e CB2 (pannello B), in piastrine murine. C+ = controllo positivo (lisato di sottocutaneo per CB1; cellule Jurkat per CB2).. Com'è possibile osservare anche in questo caso il solo CB2 sembrerebbe essere presente nei campioni considerati.

RT-PCR

Variazioni di espressione genica di CB1 e CB2, sono stati analizzate in diverse fasi del differenziamento megacariocitico, mediante analisi di RT-PCR.

Cellule staminali ematopoietiche murine sono state raccolte da midollo osseo ed indotte al differenziamento. L'RNA estratto è stato opportunamente quantificato, retrotrascritto ed amplificato mediante PCR. La presenza dei trascritti è stata analizzata al giorno 0 (raccolta cellule ed induzione al differenziamento), al giorno 3, e al giorno 5. Al quinto giorno è stato possibile separare i megacariociti -MKs-, dal resto della popolazione cellulare (indicata come cellule non megacariocitiche -NMs-). Com'è possibile osservare l'mRNA di CB2 (244 bp) è presente in tutti i campioni considerati e la quantità di trascritto non sembra essere modulata nel tempo. Differentemente la presenza dell'RNA messaggero del CB1 (204 bp) sembrerebbe aumentare durante il differenziamento.

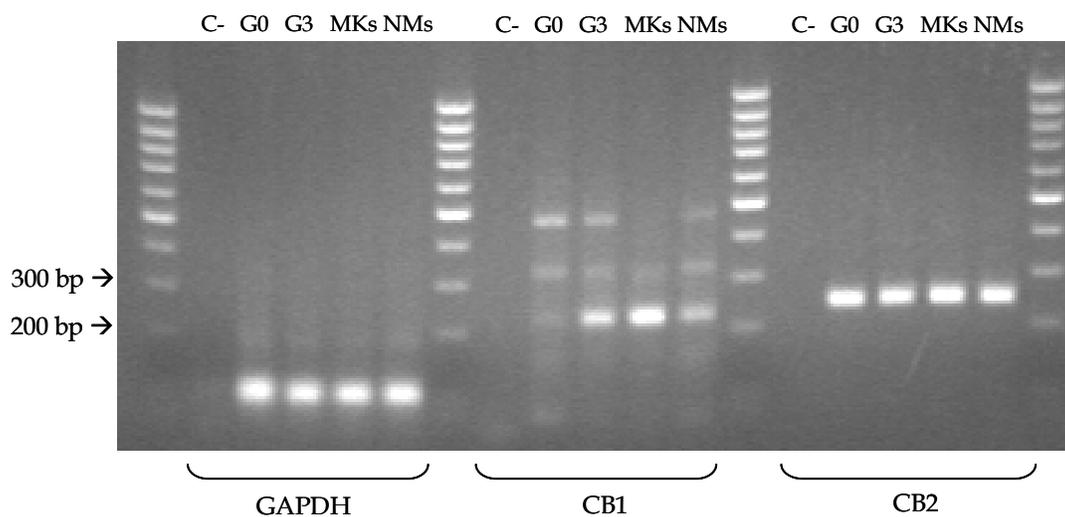


FIG. 8 ANALISI IN RT-PCR: la presenza di trascritti dei recettori cannabinici CB1 e CB2, è stata analizzata mediante RT-PCR. GAPDH (gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi - 78 bp) = controllo positivo della reazione di PCR. C- = controllo negativo.

DISCUSSIONE

Gli endocannabinoidi sono una nuova classe di mediatori lipidici endogeni che comprendono ammidi, esteri ed eteri di acidi grassi poliinsaturi a catena lunga: l'anandamide AEA (N-arachidonoiletanolammide), ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), sono i maggiori esponenti. La loro azione si esplica mediante il legame a specifici recettori, associati a proteine G eterotrimeriche (G Protein-coupled Receptors o GPCRs), di cui si conoscono due isoforme: il recettore CB1 (*Matsuda, 1997*) ed il recettore CB2 (*Munro et al., 1993*).

La presenza ubiquitaria degli endocannabinoidi correla con il loro ruolo di mediatori di più processi fisiologici: nel sistema nervoso centrale svolgono un ruolo chiave nella trasmissione sinaptica. Nei tessuti periferici agiscono controllando la secrezione di citochine e fattori di crescita in diversi tipi cellulari, quali leucociti e cellule spleniche. Nel sistema cardiovascolare agiscono come vasodilatatori. Studi più recenti stanno approfondendo un possibile coinvolgimento del sistema endocannabinoide nel controllo della proliferazione di cellule tumorali: gli endocannabinoidi, oltre ad essere in grado di ridurre l'angiogenesi, favoriscono l'accumulo di lipidi nelle cellule tumorali promuovendone così l'apoptosi.

Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato un nuovo ruolo fisiologico per gli endocannabinoidi quali molecole coinvolte nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare, sia nel sistema nervoso (*Molina-Holgada et al., 2007*) che a livello periferico (*Matias et al., 2006*). Dati recentemente pubblicati in letteratura dimostrano che gli endocannabinoidi sono anche implicati nei meccanismi che regolano proliferazione e/o differenziamento di cellule sia della linea mieloide che linfoide. Nonostante il crescente interesse, ancora pochi sono i dati disponibili riguardo al ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento megacariocitico.

Il mio progetto di dottorato nasce con l'intento di valutare il ruolo degli endocannabinoidi nei processi di megacariocitopoiesi. Come primo obiettivo del mio lavoro ho valutato la presenza dei recettori cannabinici su megacariociti e piastrine murine. A questo scopo le cellule staminali ematopoietiche murine sono state differenziate in vitro in presenza di opportuno cocktail di citochine e le cellule così differenziate (circa cento volte

più grosse), sono state isolate per sedimentazione. La presenza dei due principali recettori per gli endocannabinoidi, è stata inizialmente valutata in esperimenti di Western Blotting: come visibile dalla figura 6 il solo CB2 sembra essere espresso in megacariociti differenziati. Esperimenti analoghi sono stati condotti anche su lisati di piastrine di topo; la fig. 7 evidenzia un pattern di espressione simile: CB1, a differenza del CB2, non è rilevabile. Esperimenti di RT-PCR sono invece stati utilizzati per valutare differenze nell'espressione genica durante il differenziamento: mentre la quantità di trascritto di CB2 non sembra essere modulata nel tempo, la presenza dell'RNA messaggero del CB1 sembrerebbe aumentare durante il differenziamento (fig 8).

Dai dati in nostro possesso, che consideriamo comunque preliminari, è possibile affermare la presenza del recettore CB2 sia in piastrine che in megacariociti murini. Più complessa da definire risulta essere la presenza del recettore CB1: sebbene il trascritto sia presente nei megacariociti, la proteina sembrerebbe essere assente. È facilmente ipotizzabile che nei megacariociti, sebbene sia presente l'mRNA di CB1, questo non venga poi tradotto in proteina.

In futuro, oltre a riconfermare i dati ottenuti, eseguirò esperimenti in citofluorimetria che mi permetteranno di correlare ai diversi stadi di differenziamento (valutati mediante aumento dell'espressione dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$), l'espressione di CB1 e CB2 (indagata mediante l'utilizzo di specifici anticorpi opportunamente marcati).

Solo successivamente valuterò le vie di trasduzione del segnale attivate dalla stimolazione endocannabinoide sia in cellule indifferenziate che differenziate.

BIBLIOGRAFIA

Authi KS. TRP channels in platelet function. *Handb Exp Pharmacol*. 2007; (179):425-43.

Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Witte, L., Hicklin, D.J., Bohlen, P., Eaton, D., Lyden, D., de Sauvage, F. & Rafii, S. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature Medicine*. 2004; **10**, 64-71

Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell*. 1994; **77**(7):1117-24.

Behnke O. An electron microscope study of megakaryocytes of rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J. Ultrastruct. Res*. 1968; **24**:412-433.

Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J*. 1997; **322**(Pt 2):671-7.

Broudy, V.C. & Kaushansky, K. Thrombopoietin, the c-mpl ligand, is a major regulator of platelet production. *Journal of Leukocyte Biology*. 1995; **57**:719-725.

Bruno, S., Gunetti, M., Gammaitoni, L., Dane, A., Cavalloni, G., Sanavio, F., Fagioli, F., Aglietta, M. & Piacibello, W. In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex-vivo expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution. *Haematologica*. 2003; **88**:379-387.

Caine, Y.G., Vlodaysky, I., Hersh, M., Polliack, A., Gurfel, D., Or, R., Levine, R.F. & Eldor, A. Adhesion, spreading and fragmentation of human megakaryocytes exposed to subendothelial extracellular matrix: a scanning electron microscopy study. *Scandinavian Electron Microscopy*. 1986; **3**:1087-1094.

Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood*. 1995; **85**: 402-13.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996; **384**(6604):83-7.

De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W, Debili N. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*. 2002; **100**(4):1310-7.

Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol*. 2006; **134**(5):453-66.

Deutsch, V.R., Olson, T.A., Nagler, A., Slavin, S., Levine, R.F. & Eldor, A. The response of cord blood megakaryocyte progenitors to IL-3, IL-6 and aplastic canine serum varies with gestational age. *British Journal of Haematology*. 1995; **89**: 8-16.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992; **258**(5090):1946-9.

Di Marzo V, Blumberg PM, Szallasi A. Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol*. 2002; **12**(4):372-9.

- Di Marzo V, De Petrocellis L, Sugiura T, Waku K. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; **227**(1):281-8.
- Di Marzo V. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta*. 1998-a; **1392**(2-3):153-75.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994; **372**(6507):686-91.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*. 1998-b; **21**(12):521-8.
- Ebbe S, Stohlman F. Megakaryocytopoiesis in the rat. *Blood*. 1965; **26**:20-34.
- Ebbe S. Biology of megakaryocytes. *Prog. Hemost. Thromb*. 1976; **3**:211-229.
- Eldor, A., Levine, R.F., Caine, Y.G., HyAm, E. & Vlodavsky, I. Megakaryocyte interaction with the subendothelial extracellular matrix. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1986; **215**:399-404.
- Gandhi, M.J., Drachman, J.G., Reems, J.A., Thorning, D. & Lannutti, B.J. A novel strategy for generating platelet-like fragments from megakaryocytic cell lines and human progenitor cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2005; **35**:70-73.
- Gerrard J, White J, Rao G, Townsend D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am. J. Pathol*. 1976; **101**:353-364.
- Gewirtz, A.M. Megakaryocytopoiesis: the state of the art. *Thrombosis and Haemostasis*. 1995; **74**, 204-209.
- Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett*. 1998; **422**(1):69-73.
- Han, Z.C., Bellucci, S. & Caen, J.P. Megakaryocytopoiesis: characterization and regulation in normal and pathologic states. *International Journal of Hematolog*. 1991; **54**:3-14.
- Handagama PJ, George M, Shuman R, McEver R, Bainton DF. Incorporation of circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1987; **84**:861-865.
- Hartwig J, Italiano J Jr. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost*. 2003; **1**: 1580-6.
- Hébert TE, Bouvier M. Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem Cell Biol*. 1998; **76**(1):1-11.
- Henijnen HF, et al. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha granules. *Blood*. 1998;**91**:2313-2325.
- Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002; **68-69**:619-31.
- Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell. Biol*. 1999; **147**: 1299-312.
- Ivanovic, Z., Duchez, P., Dazey, B., Hermitte, F., Lamrissi-Garcia, I., Mazurier, F., Praloran, V., Reiffers, J., Vezon, G. & Boiron, J.M. A clinical-scale expansion of mobilized CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells by use of a new serum-free medium. *Transfusion*. 2006; **46**:126-131.

- Jiang S, Fu Y, Williams J, Wood J, Pandarinathan L, Avraham S, Makriyannis A, Avraham S, Avraham HK. Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS ONE*. 2007; **2**(7):e641.
- Jordà MA, Lowenberg B, Delwel R. The peripheral cannabinoid receptor Cb2, a novel oncoprotein, induces a reversible block in neutrophilic differentiation. *Blood*. 2003; **101**(4):1336-43. Epub 2002 Oct 24.
- Jorda MA, Rayman N, Valk P, De Wee E, Delwel R. Identification, characterization, and function of a novel oncogene: the peripheral cannabinoid receptor Cb2. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; **996**:10-6.
- Jung J, Lee SY, Hwang SW, Cho H, Shin J, Kang YS, Kim S, Oh U. Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem*. 2002; **277**(46):44448-54. Epub 2002 Sep 11.
- Kaushansky K, Drachman JG. The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene*. 2002; **21**:3359-3367.
- Kaushansky, K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *New England Journal of Medicine*. 2006; **354**:2034-2045.
- Kaushansky, K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005b; **1044**:139-141.
- Kaushansky, K. Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003; **1**:1587-1592.
- Kaushansky, K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*. 1995; **86**:419-431.
- Kaushansky, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005a; **115**:3339-3347.
- Kirito K, Kaushansky K. Transcriptional regulation of megakaryopoiesis: thrombopoietin signaling and nuclear factors. *Curr Opin Hematol*. 2006; **13**(3):151-6.
- Kunos G, Járαι Z, Bátkai S, Goparaju SK, Ishac EJ, Liu J, Wang L, Wagner JA. Endocannabinoids as cardiovascular modulators. *Chem Phys Lipids*. 2000; **108**(1-2):159-68.
- Kuter, D.J., Gminski, D.M. & Rosenberg, R.D. Transforming growth factor beta inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood*. 1992; **7**:619-626
- Lannutti, B.J., Blake, N., Gandhi, M.J., Reems, J.A. & Drachman, J.G. Induction of polyploidization in leukemic cell lines and primary bone marrow by Src kinase inhibitor SU6656. *Blood*. 2005; **105**:3875-3878.
- Levine RF. Isolation and characterization of normal human megakaryocytes. *Br J Haematol*. 1980; **45**(3):487-97.
- Lok S, Foster DC. The structure, biology and potential therapeutic applications of recombinant thrombopoietin. *Stem Cells*. 1994; **12** (6):586-98.
- Long M, Williams N, Ebbe S. Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor. *Blood*. 1982; **59**:569-575.
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; **91**(8):3171-80. Epub 2006 May 9.

- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995; **50**(1):83-90.
- Molina-Holgado F, Rubio-Araiz A, García-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, Arévalo-Martín A, Gómez-Torres O, Molina-Holgado E. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur J Neurosci.* 2007; **25**(3): 629-634.
- Mori, M., Tsuchiyama, J. & Okada, S. Proliferation, migration and platelet release by megakaryocytes in long-term bone marrow culture in collagen gel. *Cell Structure and Function.* 1993; **18**:409-417.
- Mukhopadhyay S, Shim JY, Assi AA, Norford D, Howlett AC. CB(1) cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling. *Chem Phys Lipids.* 2002; **121**(1-2):91-109.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993; **365**(6441):61-5.
- Nagata N, Muro Y, Todokoro K. Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J. Cell Biol.* 1997; **139**:449-457.
- Nakao K, Angrist A. Membrane surface specialization of blood platelet and megakaryocyte. *Nature.* 1968; **217**:960-961.
- Odell T, Jackson C, Friday T. Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy. *Blood.* 1970; **35**:775-782.
- Odell TT Jr, Jackson CW, Reiter RS. Generation cycle of rat megakaryocytes. *Exp. Cell Res.* 1968; **53**:321-328.
- Ogawa D. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1993; **81**:2844-2853.
- Patel, S.R., Hartwig, J.H. & Italiano, J.E. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *Journal of Clinical Investigation.* 2005; **115**:3348-3354.
- Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2003; **4**(11):873-84.
- Prescott SM, Majerus PW. Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *J Biol Chem.* 1983; **258**(2):764-9.
- Radley JM, Scurfield G. The mechanism of platelet release. *Blood.* 1980; **56**: 996-9.
- Randall MD. Endocannabinoids and the haematological system. *Br J Pharmacol.* 2007; **152**(5):671-5. Epub 2007 Aug 20.
- Ravid K, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J. Cell. Physiol.* 2002; **190**:7-20.
- Schulze H, Shivdasani RA. Molecular mechanisms of megakaryocyte differentiation. *Semin Thromb Hemost.* 2004; **30**(4):389-98.
- Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *J. Thromb Hemost.* 2005; **3**:1717-1724.
- Sohma Y, Akahori H, Seki N, Hori T, Ogami K, Kato T, Shimada Y, Kawamura K, Miyazaki H. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett.* 1994; **353**(1):57-61.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature.* 1997; **388** (6644):773-8.

- Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Kishimoto S, Kondo S, Waku K. Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonoylglycerol, and cannabinoid CB1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonoylglycerol a possible vasomodulator? *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; **243**(3):838-43.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; **215**(1):89-97.
- Sunita R. Patel, John H. Hartwig, and Joseph E. Italiano, The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets *Jr. Clin Invest.* 2005; **115**(12): 3348-3354.
- Tomer, A., Harker, L.A. & Burstein, S.A. Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. *Blood*, 1988; **71**:1244-1252.
- Tomer, A., Harker, L.A. & Burstein, S.A. Purification of human megakaryocytes by fluorescence-activated cell sorting. *Blood*. 1987; **70**, 1735-1742.
- Valk P, Verbakel S, Vankan Y, Hol S, Mancham S, Ploemacher R, Mayen A, Löwenberg B, Delwel R. Anandamide, a natural ligand for the peripheral cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for hematopoietic cells. *Blood*. 1997; **90**(4):1448-57.
- Xie XQ, Chen JZ, Billings EM. 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins*. 2003; **53**(2):307-19.
- Yamada F. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat. (Basel)*. 1957; **29**:267-290.
- Zauli, G. & Catani, L. Human megakaryocyte biology and pathophysiology. *Critical Reviews in Oncology/hematology*. 1995; **21**:135-157.
- Zucker-Franklin, D. & Petursson, SThrombocytopoiesis - analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megakaryocytes. *Journal of Cell Biology*. 1984; **99**:390-402.

Durante questo primo anno di dottorato, ho svolto anche una parte di lavoro relativa ad un progetto di collaborazione con il Laboratorio di Microbiologia, (Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche, Farmacologiche, dell'Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"), diretto dalla Professoressa M. G. Martinotti.

L'obiettivo del gruppo di ricerca consiste nella selezione di ceppi microbici produttori di biosurfattanti, utilizzabili in applicazioni biotecnologiche ambientali, alimentari, farmaceutiche e biomediche. In particolare, l'interesse della ricerca è stato focalizzato sulla purificazione e caratterizzazione delle molecole con proprietà anti-adesive e antibiotiche contro i microrganismi patogeni.

Biosurfattanti precedentemente isolati e purificati mediante estrazione organica, sono stati saggiati per la loro attività antiaggregante.

INTRODUZIONE

I BIOSURFATTANTI

I biosurfattanti sono composti prodotti da un ampio spettro di microrganismi, che evidenziano spiccata attività di superficie ed emulsionante; sono molecole anfipatiche con porzioni sia idrofiliche che idrofobiche, e si ripartiscono preferenzialmente nell'interfaccia tra le fasi fluide con differenti gradi di polarità e legami di idrogeno, quali le interfaccia olio-acqua o aria-acqua.

I biosurfattanti, che comprendono un'ampia gamma di strutture chimiche (Desai and Banat, 1997; Ahimou F. et al., 2000), si possono suddividere in varie tipologie: lipopeptidi (sintetizzati principalmente da bacilli); glicolipidi (sintetizzati da specie di *Pseudomonas* e *Candida*), fosfolipidi (sintetizzati da *Thiobacillus thiooxidans*), complessi lipide-polisaccaride (sintetizzati da specie di *Acinetobacter*), nonché le stesse superfici cellulari microbiche (Desai and Banat, 1997; Bodour and Miller-Maier, 2002). Poiché è stato osservato che specie differenti di *Bacillus* possono produrre bioemulsionanti diversi, con distinte attività emulsificanti e di superficie (Cooper and Goldenberg, 1987), è ragionevole presupporre proprietà diverse e diverse funzioni fisiologiche, per gruppi differenti di biosurfattanti.

I biosurfattanti microbici, se confrontati con i surfattanti di origine chimica, presentano numerosi vantaggi: minore tossicità, più elevato grado di biodegradabilità e maggiore capacità di funzionare a temperature e pH estremi (Cameotra and Makkar, 1998). Recentemente inoltre, sono stati pubblicati lavori sulla produzione di biosurfattanti da substrati di rifiuto a basso costo, che quindi diminuiscono le spese di produzione (Otto et al., 1999; Dubey and Juwarkar, 2005; Makkar and Cameotra, 2002; Nitschke and Pastore, 2003; Maneerat, 2005).

I BIOSURFATTANTI: LE APPLICAZIONI

La natura anfipatica dei biosurfattanti ne giustifica l'ampio utilizzo in applicazioni ambientali: incrementando la solubilità degli inquinanti idrofobici, ne aumentano il potenziale di biodegradazione (Mulligan., 1984).

A dispetto delle loro potenzialità e origine biologica però, solo pochi studi sono stati condotti in campo biomedico (Banat et al., 2000; Benincasa et al., 2004; Cameotra and Makkar., 2004).

Molti biosurfattanti mostrano spiccata attività antimicrobica: diversi surfattanti appartenenti ai gruppi delle iturine, delle biosurfattine, dei lipidi mannosil-eritritoli, hanno dimostrato una forte attività antibatterica, antifungina e antivirale (Cameotra and Makkar, 2004).

Altri utilizzi medici rilevanti di queste molecole derivano dal loro ruolo di agenti antiadesivi per i patogeni: i due meccanismi chiave della colonizzazione batterica di superfici, lo sciamaggio e la formazione di biofilm (comunità strutturate di cellule batteriche racchiuse in una matrice polimerica autoprodotta ed adesa ad una superficie), incrementano la probabilità di infezioni nosocomiali. Recenti evidenze sperimentali dimostrano che i biosurfattanti, inibendo l'adesione di organismi patogeni a superfici solide e ai siti di infezione, limitano la formazione dei biofilm e distruggono quelli esistenti (Kuiper et al., 2004). Il pre-trattamento con biosurfattanti, può quindi costituire un nuovo ed efficace mezzo per combattere la colonizzazione da parte di microrganismi patogeni (Singh and Cameotra, 2004). Alcuni esperimenti sono già stati condotti: il precoating con soluzioni di surfattina di cateteri uretrali di vinile, ha diminuito la quantità di biofilm prodotto da *S. typhimurium*, *S. enterica*, *E. coli* e *P. mirabilis* (Mireles et al., 2001). Biosurfattanti prodotti da *L. acidophilus* inibiscono invece la formazione di biofilms di uropatogeni e lieviti, su gomma di silicone (Velraeds et al., 1996; Velraeds et al., 1998; Busscher et al., 1997 and Reid G., 2000). Strategie di prevenzione di colonizzazione microbica su protesi vocali di gomma di silicone, sono state poi documentate da Rodrigues (Rodrigues et al., 2004; Rodrigues et al., 2006): biosurfattanti ottenuti dai ceppi probiotici *L. lactis* 53 e *S. thermophilus* A, inibiscono l'adesione a gomma di silicone pre-rivestita con biosurfattanti di quattro ceppi batterici e di due ceppi di lieviti, isolati da protesi vocali espianate. Recentemente è stato anche osservato che il pretrattamento di superfici di

acciaio con biosurfattante prodotto da un ceppo di *P. fluorescens*, è in grado di ridurre significativamente i livelli di adesione di *Listeria monocytogenes* LO28 (Meylheuc et al., 2006).

Altre applicazioni biomediche e terapeutiche dei biosurfattanti comprendono la produzione di anticorpi convenzionali e monoclonali per il rilevamento sierologico di farmaci, anticorpi, tossine ed altre sostanze a basso peso molecolare (Singh and Cameotra, 2004).

Alcuni biosurfattanti rappresentano valide alternative a medicine sintetiche e ad agenti antimicrobici e possono essere utilizzati come agenti terapeutici sicuri ed efficaci (Cameotra and Makkar, 2004; Rodrigues et al., 2006).

In particolare, i biosurfattanti della famiglia delle surfattine, prodotti in larga misura da ceppi di *Bacillus*, sono in grado di interagire con membrane artificiali e biomembrane come, ad esempio, protoplasti batterici e virus con pericapside (Vollenbroich et al., 1997a; Vollenbroich et al., 1997b).

Le surfattine, in aggiunta a proprietà antifungine ed antibatteriche, sono state inoltre collegate a parecchie attività biologiche, in particolare: inibizione della formazione di coaguli di fibrina, induzione della formazione di canali ionici nelle membrane a doppio strato lipidico, inibizione dell'AMP ciclico, inibizione selettiva della fosfolipasi citosolica A2 (PLA2) delle piastrine ed attività antinfiammatoria (Kim et al., 1998). È stato inoltre osservato che la surfattina C è in grado di aumentare l'attivazione di pro-urochinasi (attivatore del plasminogeno) e promuovere il cambiamento conformazionale in plasminogeno, inducendo così un'aumentata fibrinolisi sia *in vivo* che *in vitro* (Kikuchi and Hasumi, 2002). In un modello di embolia polmonare di ratto la surfattina C, quando inoculata in associazione alla pro-urochinasi, aumenta la lisi del coagulo plasmatico (Kikuchi and Hasumi, 2003). Più recentemente (Lim et al., 2005), è stata evidenziata l'attività antitrombotica di alcune isoforme di surfattina isolate da *B. subtilis*: prevenendo l'aggregazione piastrinica viene inibita la formazione di coaguli di fibrina e aumentata la fibrinolisi.

SCOPO DEL LAVORO

I materiali biosintetici, in modo particolare i polimeri, sono ampiamente utilizzati per applicazioni biomediche: valvole cardiovascolari, organi artificiali e biosensori (Griffith 2000; Langer and Tirrel 2004).

L'esposizione a materiali estranei all'organismo ricevente, e in particolar modo il contatto con il flusso sanguigno, causa tuttavia interazioni non specifiche con cellule e proteine; questo biofouling include adsorbimento spontaneo di proteine plasmatiche, adesione ed attivazione di piastrine, leucociti e, se presenti, batteri. Sono di conseguenza osservabili fenomeni quali: formazione di trombi, eccessivo wound-healing ed insorgenza di infezioni (Frank et al., 2000; Thomsen and Gretzer 2001; Douglas 2003).

L'interfaccia tra il biomateriale e l'ambiente biologico, poiché influenza le interazioni proteina-superficie cellulare, ha un ruolo determinante in questi processi. Nel corso degli anni, l'approccio più comune per aumentare la compatibilità, è stato quello di modificare le proprietà all'interfaccia dei supporti biomedici in uso (Wang et al., 2004; Mao et al., 2004); sebbene alcune delle strategie proposte abbiano effettivamente aumentato la biocompatibilità, ulteriori miglioramenti sono non solo auspicabili, ma possibili.

Un approccio alternativo agli attuali sistemi, potrebbe essere secondo noi rappresentato dal pretrattamento del biomateriale con soluzioni di biosurfattanti biologicamente attivi, al fine di ridurre sia i due meccanismi chiave della colonizzazione batterica (sciamaggio e formazione di biofilm), sia l'adesione e attivazione piastrinica. Con questo obiettivo, le proprietà antiaggreganti di due particolari biosurfattanti sono state da me testate.

METODI

I biosurfattanti

I due ceppi produttori di biosurfattanti sono stati isolati da un ammendante commerciale (Marcopolo Engineering SpA, Borgo Sandalmazzo), e purificati mediante estrazione organica. Poiché al momento si sta pesando ad una copertura brevettuale, i due biosurfattanti verranno rispettivamente indicati come BS1 e BS2.

Preparazione delle piastrine: gel-filtrazione

Il sangue (20-40 mL) viene prelevato da donatori volontari sani, in età compresa tra i 20 e 35 anni, che non abbiano assunto farmaci nei dieci giorni precedenti il prelievo. Viene utilizzato come anticoagulante ACD (130 mM acido citrico, 152 mM Na-citrato e 112 mM D-glucosio), nella proporzione di una parte ogni nove di sangue; il plasma ricco di piastrine (PRP) è il surnatante ottenuto da una centrifugazione a 180 x g per 10 minuti a 20° C. Con una seconda centrifugazione a 300 x g, per 10 minuti, a 20° C, si ottiene un pellet ricco in piastrine, che viene risospeso in un piccolo volume di ACD. Le piastrine sono poi separate dalle componenti plasmatiche mediante gel-filtrazione su colonna di Sepharose CL-2B equilibrata con tampone Tyrode (Hepes 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.9 mM, NaHCO₃ 12 mM, pH 7.4). Le piastrine eluite vengono contate al microscopio ottico su camera di Burker ad un ingrandimento di 10 x 40, e portate alla concentrazione richiesta con tampone Tyrode; prima di utilizzarle per gli esperimenti vengono lasciate riposare per circa 30 minuti.

Preparazione di plasma ricco in piastrine (platelet rich plasma “PRP”)

Il sangue (30 mL) viene prelevato da soggetti volontari, sani, in età compresa tra i 20 e 35 anni, che non abbiano assunto farmaci nei dieci giorni precedenti il prelievo. Come anticoagulante si è utilizzato sodio citrato al 3.8 %, nella porzione di una parte ogni nove

di sangue. Centrifugando per 15 minuti, 180 x g, 20° C, si separa il plasma ricco in piastrine (PRP), da eritrociti e leucociti. Si procede quindi con la conta delle piastrine, come già precedentemente indicato. La concentrazione delle piastrine viene aggiustata nel range tra 200×10^6 cellule/mL e 250×10^6 cellule/mL, usando tampone Tyrode.

Analisi della aggregazione piastrinica

L'aggregazione piastrinica viene misurata tramite un aggregometro della Chrono Log Corporation (Mascia Brunelli). Il metodo di analisi si basa sulla misurazione prolungata nel tempo della trasmittanza di una sospensione piastrinica: all'aggiunta di sostanze che inducono aggregazione, si osserva un graduale aumento della trasmittanza, dovuta alla formazione degli aggregati. Ogni canale dispone di due pozzetti separati: uno per il campione (0% di trasmittanza) e uno per il riferimento (tampone Tyrode - 100% di trasmittanza); l'aggregazione ottica è proporzionale alla differenza di trasmittanza misurata in continuo fra il campione e il riferimento. La percentuale di aggregazione piastrinica viene monitorata in continuo, su un registratore a carta millimetrata, fino a 5 minuti dall'aggiunta dell'agonista. La temperatura viene mantenuta a 37° C e i campioni di piastrine vengono agitati magneticamente a 500 rpm. La fonte luminosa dello strumento è una lampada a tungsteno. L'aggregazione viene misurata sia in campioni di piastrine gel-filtrate (3×10^8 cellule/mL) aggiunti di 2mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ e 2mM glucosio, utili al mantenimento della funzionalità piastrinica; sia in plasma ricco in piastrine.

RISULTATI

Inibizione dell'aggregazione piastrinica

Le piastrine stimolate con agonisti fisiologici quali trombina e trombossano, vanno incontro ad un fenomeno di interazione piastrina-piastrina definito aggregazione, mediato dal legame del fibrinogeno all'integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Agonisti deboli causano aggregazione primaria (reversibile), mentre agonisti forti causano una aggregazione secondaria (irreversibile), associata alla sintesi di trombossano A₂ e alle reazioni di rilascio: la secrezione dei granuli riversa nel microambiente sanguigno molecole quali ADP e serotonina che, per prime, potenziano la formazione del tappo emostatico. Per analizzare l'aggregazione piastrinica, piastrine gel-filtrate sono state portate alla concentrazione di 3×10^8 cell/mL; campioni da 400 μL sono stati allestiti nelle apposite cuvette siliconate e posti nell'aggregometro, costantemente agitati a 37° C. L'aggregazione è stata valutata anche in plasma ricco in piastrine. Gli agonisti piastrinici utilizzati sono stati: trombina 0,02 U/mL e l'analogo stabile del trombossano, U46, 40 nM in campioni di piastrine gel-filtrate; ADP 0,3 μM per gli esperimenti condotti in plasma ricco in piastrine. Al fine di valutare l'effetto anti-aggregante delle molecole testate, i campioni, prima dell'aggiunta dell'agonista, sono stati protrattati per 3 minuti con differenti concentrazioni di biosurfattanti.

I risultati di seguito riportati, mostrano l'azione anti-aggregante dei biosurfattanti, su campioni di piastrine gel-filtrate. Com'è possibile osservare, il pretrattamento induce una diminuzione dell'aggregazione indotta da trombina, già osservabile a concentrazioni molto basse (0,7 ng/ μL) di BS1 (1A). L'effetto anti-aggregante del biosurfattante BS2, è visibile alla concentrazione di 1.2 ng/ μL (1B). BS1 e BS2 sono anche in grado di inibire aggregazione piastrinica indotta da U46 40 nM (fig. 2).

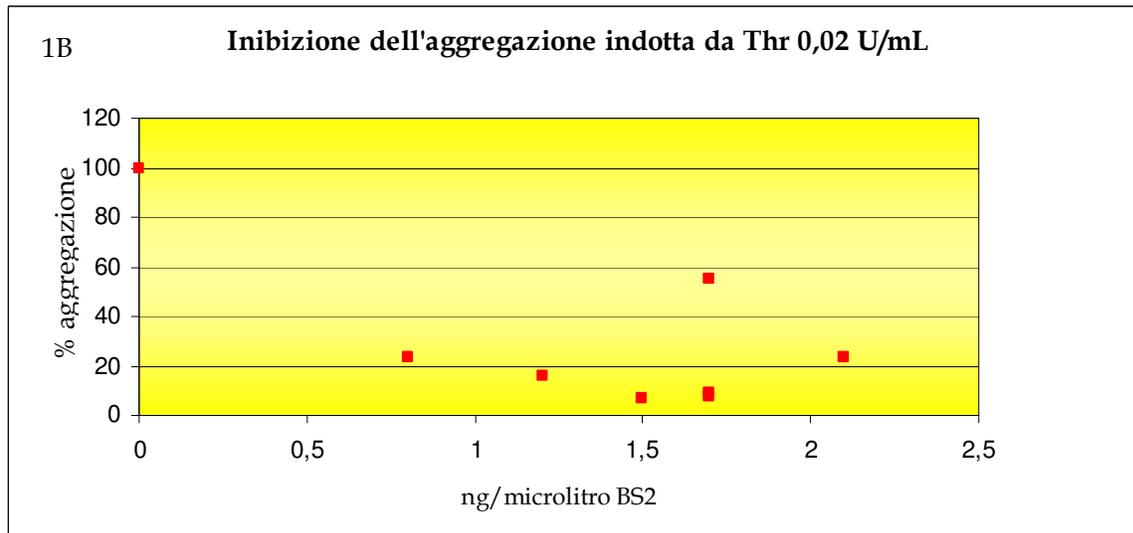
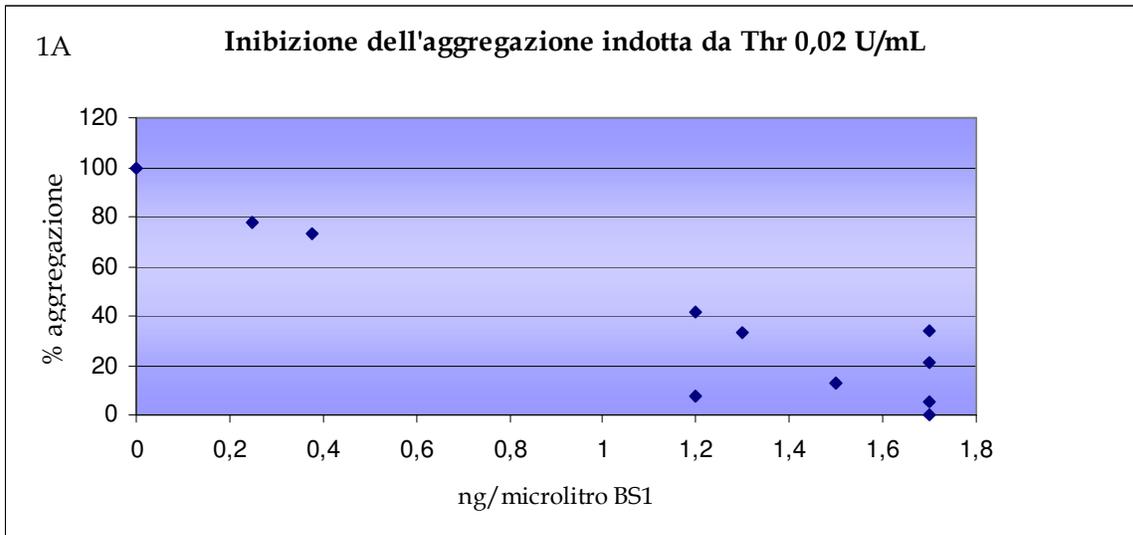


FIG.1 I biosurfattanti inibiscono l'aggregazione piastrinica indotta da Trombina. In figura sono riportate le percentuali di aggregazione indotte dalla sola trombina (100% di aggregazione) o in presenza di biosurfattanti.

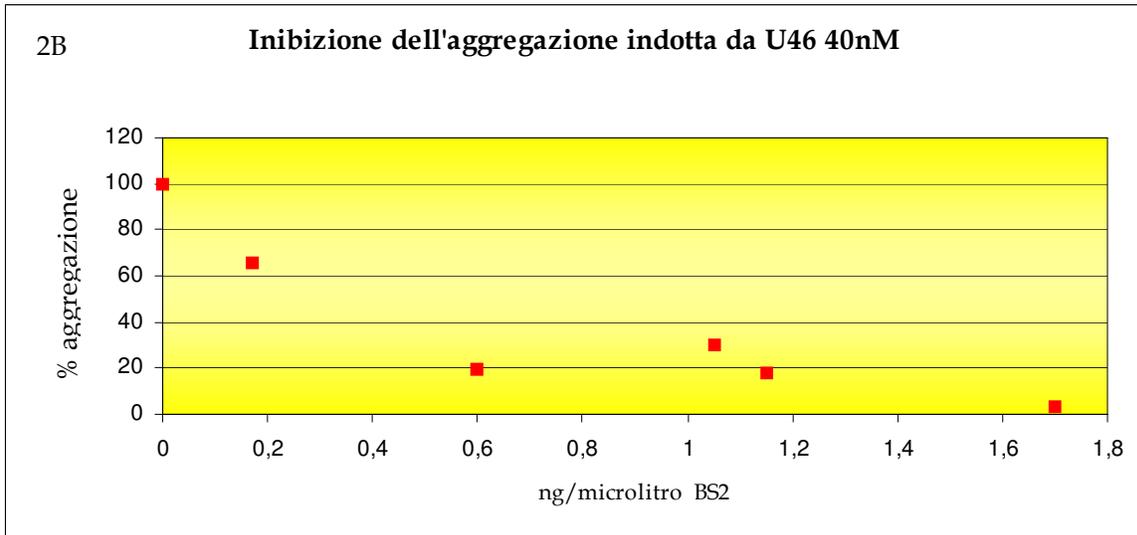
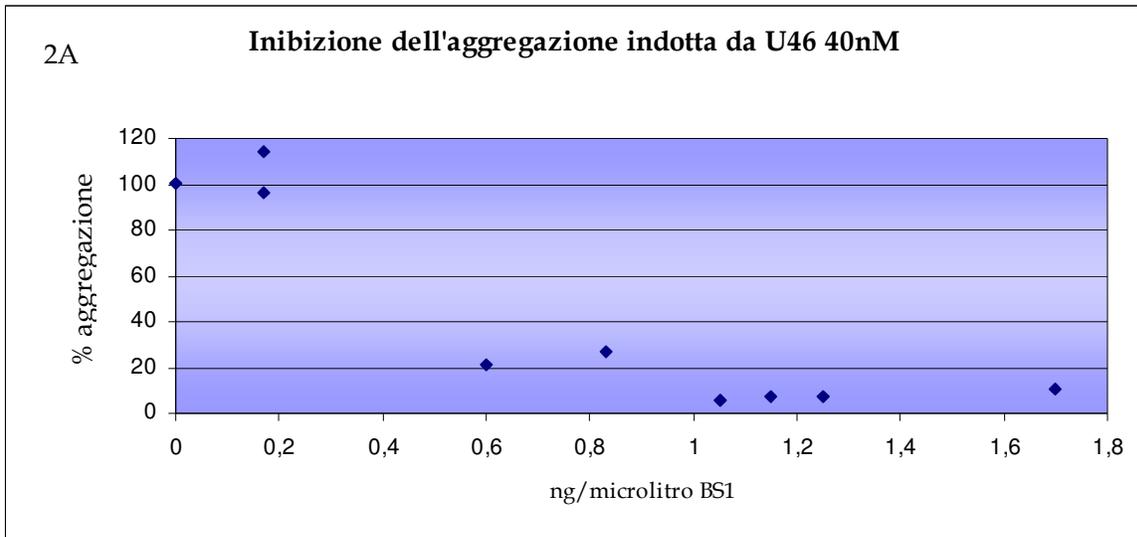


FIG.2 Inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta da U46. I grafici mostrano l'inibizione dell'aggregazione indotta da U46 (100% di aggregazione), dovuta al pre-trattamento dei campioni con biosurfattanti. L'azione di BS1 (2A), non mostra differenze significative rispetto a quella di BS2 (2B).

Gli esperimenti condotti in plasma ricco in piastrine (risultati non riportati), hanno invece mostrato risultati differenti: entrambi i biosurfattanti non sono stati in grado di inibire, nemmeno parzialmente, l'aggregazione piastrinica sperimentalmente indotta da ADP 0,3 μ M. Secondo noi è ipotizzabile che data la loro natura, i biosurfattanti siano sequestrati da proteine plasmatiche quali, ad esempio, l'albumina.

DISCUSSIONE

I biosurfattanti sono composti prodotti da un ampio spettro di microrganismi, che evidenziano spiccata attività di superficie ed emulsionante. Recenti studi riportati in letteratura, dimostrano nuove potenzialità (e di conseguenza applicazioni), di queste molecole che possiedono spiccata attività antimicrobica, antibatterica, antifungina e antivirale. Particolari tipi di biosurfattanti sembrano essere anche potenti agenti antiadesivi per i patogeni, sono infatti in grado di prevenire e contrastare i due meccanismi chiave della colonizzazione batterica di superfici (sciamaggio e la formazione di biofilm). Biosurfattanti della famiglia delle surfattine inoltre, mostrano avere attività anti-trombotica (Lim et al., 2005). Tutte queste proprietà, hanno reso i biosurfattanti molecole utilizzabili in campo biomedico; una delle applicazioni più innovative prevede l'utilizzo di queste sostanze al fine di ridurre sia i due meccanismi chiave della colonizzazione batterica (sciamaggio e formazione di biofilm), sia l'adesione e attivazione piastrinica (e di conseguenza la formazione di trombi). L'interesse del nostro lavoro è stato focalizzato proprio su quest'ultima proprietà: l'obiettivo è stato quello di testare le proprietà antiaggreganti di due particolari biosurfattanti (BS1 e BS2). I grafici riportati in figura 1 e 2, mostrano che entrambe le molecole sono in grado di ridurre l'aggregazione di piastrine gel-filtrate, indotta da forti agonisti piastrinici quali trombina (fig. 1) e U46 (fig.2). Una parte del lavoro (risultati non mostrati), è stata condotta in plasma ricco in piastrine; in queste condizioni le molecole non hanno ridotto nemmeno parzialmente l'aggregazione (artificialmente indotta da ADP 0,3 μ M). La nostra ipotesi è che, considerata la loro natura, i biosurfattanti in PRP siano sequestrati da proteine plasmatiche; per osservare effetti significativi la loro concentrazione dovrebbe essere innalzata notevolmente. Dai dati in nostro possesso, possiamo comunque affermare che BS1 e BS2 si comportano da agenti anti-aggreganti in piastrine gel-filtrate. Studi futuri saranno condotti per valutare se concentrazioni maggiori rispetto a quelle attualmente utilizzate di BS1 e BS2, siano in grado di ridurre l'aggregazione in plasma ricco in piastrine.

BIBLIOGRAFIA

- Ahimou F, Jacques P, Deleu M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb Technol.* 2000; **27**(10):749-754.
- Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000; **53**(5):495-508.
- Benincasa M, Abalos A, Oliveira I, Manresa A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2004; **85**(1):1-8.
- Bodour AA, Miller-Maier RM. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganism. *J. Microbiol. Methods.* 1998; **32**:273-280
- Busscher HJ, van Hoogmoed CG, Geertsema-Doornbusch GI, van der Kuijl-Booij M, van der Mei HC. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Appl Environ Microbiol.* 1997; **63**(10):3810-7.
- Cameotra SS, Makkar RS. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr Opin Microbiol.* 2004; **7**(3):262-6.
- Cameotra SS, Makkar RS. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998; **50**(5):520-9.
- Cooper DG, Goldenberg BG. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. *Appl Environ Microbiol.* 1987; **53**(2):224-229.
- Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol* 1997; **61**(1):47-64.
- Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003; **11**(1):30-6.
- Dubey KV, Juwarkar AA, Singh SK. Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. *Biotechnol Prog.* 2005; **21**(3):860-7.
- Frank RD, Dresbach H, Thelen H, Sieberth HG. Glutardialdehyde induced fluorescence technique (GIFT): a new method for the imaging of platelet adhesion on biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 2000; **52**(2):374-81.
- Griffith, L.G. Polymeric biomaterials. *Acta Mater.* 2000; **48**: 263-277.
- Kikuchi T, Hasumi K. Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 2002; **1596**(2):234-45.
- Kikuchi T, Hasumi K. Enhancement of reciprocal activation of prourokinase and plasminogen by the bacterial lipopeptide surfactins and iturin Cs. *J Antibiot (Tokyo).* 2003; **56**(1):34-7.
- Kim K, Jung SY, Lee DK, Jung JK, Park JK, Kim DK, Lee CH. Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2. *Biochem Pharmacol.* 1998; **55**(7):975-85.
- Kuiper I, Lagendijk EL, Pickford R, Derrick JP, Lamers GE, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJ, Bloemberg GV. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol.* 2004; **51**(1):97-113.

- Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004; **428**(6982):487-92.
- Lim JH, Park BK, Kim MS, Hwang MH, Rhee MH, Park SC, Yun HI. The anti-thrombotic activity of surfactins. *J Vet Sci*. 2005; **6**(4):353-5
- Makkar RS, Cameotra SS. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002; **58**(4):428-34. Epub 2002 Jan 26.
- Maneerat S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources *J. Sci. Technol*. 2005; **27**(3):675-683
- Mao C, Qiu Y, Sang H, Mei H, Zhu A, Shen J, Lin S. Various approaches to modify biomaterial surfaces for improving hemocompatibility. *Adv Colloid Interface Sci*. 2004; **110**(1-2):5-17
- Meylheuc T, Renault M, Bellon-Fontaine MN. Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*. 2006; **109**(1-2):71-8. Epub 2006 Feb 20.
- Mireles JR 2nd, Toguchi A, Harshey RM. Salmonella enterica serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol*. 2001; **183**(20):5848-54.
- Mulligan C.N., Cooper D.G., Neufeld R.J., *Selection of microbes producing* biosurfactants in media without hydrocarbons. *J. Ferment. Technol*. 1984; **62**: 311-314
- Nitschke M, Pastore G. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. *Appl Biochem Biotechnol*. 2003; **105 -108**:295-301.
- Otto RT, Daniel HJ, Pekin G, Müller-Decker K, Fürstenberger G, Reuss M, Syldatk C. Production of sophorolipids from whey. II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999; **52**(4):495-501.
- Reid, G. In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus*. NCFM. TM. as a possible probiotic for the urogenital tract. *Int Dairy J* 2000; **10**:415-419
- Rodrigues L, van der Mei H, Teixeira JA, Oliveira R. Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; **66**(3):306-11.
- Rodrigues LR, Banat IM, Teixeira JA, Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine. *JAC*. 2006; **57**(4):609-18
- Rodrigues LR, Banat IM, van der Mei HC, Teixeira JA, Oliveira R. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. *J Appl Microbiol*. 2006; **100**(3):470-80.
- Singh P, Cameotra SS. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol*. 2004; **22**(3):142-6.
- Thomsen P, Gretzer C. Macrophage interactions with modified material surfaces *Curr Opin Solid Mater Sci*. 2001; **5**:163-176
- Velraeds MM, van de Belt-Gritter B, van der Mei HC, Reid G, Busscher HJ. Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant. *J Med Microbiol*. 1998; **47**(12):1081-5.

Velraeds MM, van der Mei HC, Reid G, Busscher HJ. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 1996; **62**(6):1958-63.

Vollenbroich D, Ozel M, Vater J, Kamp RM, Pauli G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals.* 1997-a; **25**(3):289-97.

Vollenbroich D, Pauli G, Ozel M, Vater J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.* 1997-b; **63**(1):44-9.

Wang YX, Robertson JL, Spillman WB Jr, Claus RO. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharm Res.* 2004; **21**(8):1362-73

ATTIVITA' FORMATIVA

SEMINARI FREQUENTATI:

4 ottobre 2007

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Meccanismi molecolari di fibrogenesi nella steatoepatite non alcolica" - Prof. Fabio Marra,

20 dicembre 2007

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Nanotechnology and Bioimaging, novel approaches in diagnosis and drug deliver"

20 dicembre 2007

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Human papillomavirus loads and its correlation with non-melanoma skin cancer " - Dott. Soenke Weissenborn

14 gennaio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Biologia molecolare e genetica in ambito forense: principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche" - Tenente Dott. Giorgio Portera,

21 gennaio 2008 - Aula Riunioni Dipartimento

Aula Riunioni del Dipartimento, via Solaroli 17 - Novara
"K+ channels in the heart: in and out of control" - Dr. Susanne Radicke

23 gennaio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Integrin trafficking and tumour cell invasiveness" - Dr. Jim Norman

24 gennaio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"La Microscopia a Forza Atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni" - Prof. Mario Raspanti

6 febbraio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo" - Dott. Gianluca DeBellis,

7 febbraio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"La proteina HMGB1 é un segnale di danno tissutale" - Prof. M. E. Bianchi,

21 febbraio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"New treatment strategies for multiple myeloma"- Prof. A. Palumbo,

28 febbraio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Caratterizzazione molecolare della leucemia linfatica cronica" - Prof. Valter Gattei,

5 marzo 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Analytic vaccinology and human cytomegalovirus: human monoconal antibodies as tools to

identify novel antigens for protective vaccination" - Annalisa Macagno, PhD,

6 marzo 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"Applications of gene expression profiling to cancer research" - Prof. Enzo Medico,

7 marzo 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"Fatty liver preservation against ischemia-reperfusion injury"- Dr. Joan Rossello Catafau,

13 marzo 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"Il sistema Ghrelin: aspetti endocrini e metabolici" - F. Broglio, C. Gauna

20 marzo 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"Immunologia della psoriasi" - Prof. Giampiero Girolomoni,

2 aprile 2008

Sala Conferenze del DISCAFF, via Bovio 6 - Novara

"p53 involvement in Alzheimer disease: how fibroblasts may link neurons with lymphocytes" - Prof. Maurizio Memo,

3 aprile 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"Mutazioni del gene dell'insulina come causa di diabete neonatale/infantile: un nuovo esempio di malattia da misfolding" - Prof. Fabrizio Barbetti,

9 aprile 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria" - Prof. Gaetano Cairo,

14 aprile 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"Interazioni tra tumore e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica: il ruolo della via metabolica del mevalonato" - Prof. Massimo Massaia,

16 aprile 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"The herpesvirus DNA polymerases: a model for new antiviral drug discovery" - Prof. Giorgio Palù

17 aprile 2008

Aula Riunioni Dipartimento, via Solaroli 17 - Novara

"Epidemiologia dell'infezione da HPV e del cancro della cervice uterina: un modello dinamico" - Dr. Iacopo Baussano,

24 aprile 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"Ghrelin e pancreas endocrino" - Prof. Riccarda Granata

15 maggio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"The mechanisms of cell infection with hepatitis C virus- novel potential targets for therapeutic interventions" - Prof. Agata Budkowska

22 maggio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"La ricerca farmacologica: dal laboratorio alla clinica" - Dott. Domenico Valle

23 maggio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Sistema degli Endocannabinoidi: nuovo target terapeutico per l'obesità e le sue complicanze cardio-metaboliche" - Prof. Uberto Pagotto,

26 maggio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Copy number variations: non solo ritardo mentale" - Prof. Orsetta Zuffardi,

3 giugno 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Il Trasferimento tecnologico dall'università all'impresa"- Fabrizio Conicella , Kevin Romani e Alberto Baldi,

5 giugno 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Cap-Analysis Gene Expression (CAGE) Analysis of transcriptional complexity and regulation" - Dr. Piero Carninci,

11 giugno 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Il Trasferimento tecnologico dall'università all'impresa"- Fabrizio Conicella , Kevin Romani e Alberto Baldi,

12 giugno 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Mechanical Ventilation and Multiple Organ Failure" - Dr. Frans B. Plotz,

13 giugno 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Problem solving in patologia epatica" - Prof. Gavino Faà,

26 giugno 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Tecniche FISH nello studio dei linfomi non-Hodgkin" - Dott.ssa Maria Grazia Tibiletti,

30 giugno 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"From megakaryocytes to platelets regulation, environment and pathology" - Dott.ssa Alessandra Balduini,

1 luglio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Recombinant protein expression" - Dr. Andrew Bradbury

2 luglio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Recombinant antibodies and other affinity reagents" - Dr. Andrew Bradbury

3 luglio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara
"Recenti Aspetti in tema di malattie uromodulina associate" - Prof. Scolari,

16 luglio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"Display technologies: phage yeast bacteria and ribosoma" - Dr. Andrew Bradbury

18 luglio 2008

Aula Magna della Facoltà di Medicina e Chirurgia, via Solaroli 17 - Novara

"Fluorescent proteins" - Dr. Andrew Bradbury

SEZIONE 2

CORSI FREQUENTATI:

Corso: "Programma di formazione finalizzato alla radioprotezione in relazione alle mansioni dei Lavoratori addetti, dei rischi specifici cui sono esposti, delle norme di protezione sanitaria, delle modalità di esecuzione del lavoro e delle norme interne al Laboratorio degli Isotopi Radioattivi del Dipartimento di Scienze Mediche"

Relatore: *Dr. Marco Brambilla*, Esperto Qualificato per al Radioprotezione

Data: 10-07-2008

Sede: Laboratorio degli Isotopi Radioattivi del Dipartimento di Scienze Mediche - Novara

Corso: lingua inglese

Insegnante: *Colin Irving Bell*

CONGRESSI FREQUENTATI:

Congresso: CNBX

Sede: Perugia

Data: 17-19 settembre 2008

COMUNICAZIONI A CONGRESSI:

Congresso: CNBX

Sede: Perugia

Data: 17-19 settembre 2008

Titolo: "Inhibition of platelet aggregation by the phytoestrogen 8-prenylnaringenin"

Autori: M. Zanfa, S. Baldassarri, C. Sarasso, **A. Bagarotti**, A. Rastoldo, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia

Congresso: CNBX

Sede: Perugia

Data: 17-19 settembre 2008

Titolo: "Different expression of estrogen receptors gpr30 and ER β isoforms in megakaryoblastic and erythroleukemia cell lines"

Autori: S. Bergante, **A. Bagarotti**, C. Di Vito, S. Baldassarri, A. Rastoldo, M. Zanfa, F. Sinigaglia and A. Bretoni

Congresso: 53° National meeting of Italian Society of Biochemistry and Molecular biology

Sede: Riccione

Data: 23-26 settembre 2008

Titolo: "Dehydroepiandrosterone inhibits platelet aggregation with a cGMP-dependent mechanism"

Autori: A. Rastoldo, C. Sarasso, S. Baldassarri, M. Zanfa, **A. Bagarotti**, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia

Congresso: 9a Riunione del Gruppo di Studio Piastrine

Sede: S. Pellegrino Terme

Data: 12-14 ottobre 2008

Titolo: "Study of the mechanisms of platelet inhibition induced by the phytoestrogen 8-PN"

Autori: M. Zanfa, S. Baldassarri, C. Sarasso, **A. Bagarotti**, A. Rastoldo, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia

Congresso: 9a Riunione del Gruppo di Studio Piastrine

Sede: S. Pellegrino Terme

Data: 12-14 ottobre 2008

Titolo: "The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB1/CB2 receptors"

Autori: S. Baldassarri, A. Bertoni, A. Bagarotti, C. Sarasso, M. Zanfa, A. Rastoldo, C. Di Vito, M.V. Catani, L. Avigliano, M. Maccarrone, M. Torti, F. Sinigaglia

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO:

"The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB1/CB2 receptors
Baldassarri S, Bertoni A, Bagarotti A, Sarasso C, Zanfa M, Catani MV, Avigliano L, Maccarrone M, Torti M, Sinigaglia F - *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (in press)