

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



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

**Relazione 1° anno**

**STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI RECETTORI  
DEGLI ESTROGENI DURANTE IL  
DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOCITARIO**

Candidato: Clara Di Vito  
*Tutor: Prof. Fabiola Sinigaglia*

# ***SEZIONE 1***

## **RISULTATI SCIENTIFICI**

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 I MEGACARIOCITI .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 LA MEGACARIOPOIESI .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 LA REGOLAZIONE DELLA MEGACARIOPOIESI E DELLA TROMBOPOIESI .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 LA FORMAZIONE DELLE PIASTRINE .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 LE PIASTRINE .....</b>	<b>14</b>
<b>1.6 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI .....</b>	<b>15</b>
<b>2. SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 LINEE CELLULARI E COLTURE .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 ESTRAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI DA SANGUE DI CORONE OMBELICALE E     GENERAZIONE <i>IN VITRO</i> DI MEGACARIOCITI .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 ISOLAMENTO DELLE PIASTRINE .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4 ESTRAZIONE DELL'RNA, QUANTIFICAZIONE E RETROTRASCRIZIONE .....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 REAL TIME PCR .....</b>	<b>25</b>
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI NEL DIFFERENZIAMENTO DI LINEE MEGACARIOBLASTICHE</b>	<b>26</b>
<b>4.2 I RECETTORI PER GLI ESTROGENI NEL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOCITARIO .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3 I RECETTORI PER GLI ESTROGENI NELLE PIASTRINE .....</b>	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>32</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>35</b>
<b>7. ATTIVITÀ FORMATIVA .....</b>	<b>43</b>

# 1. INTRODUZIONE

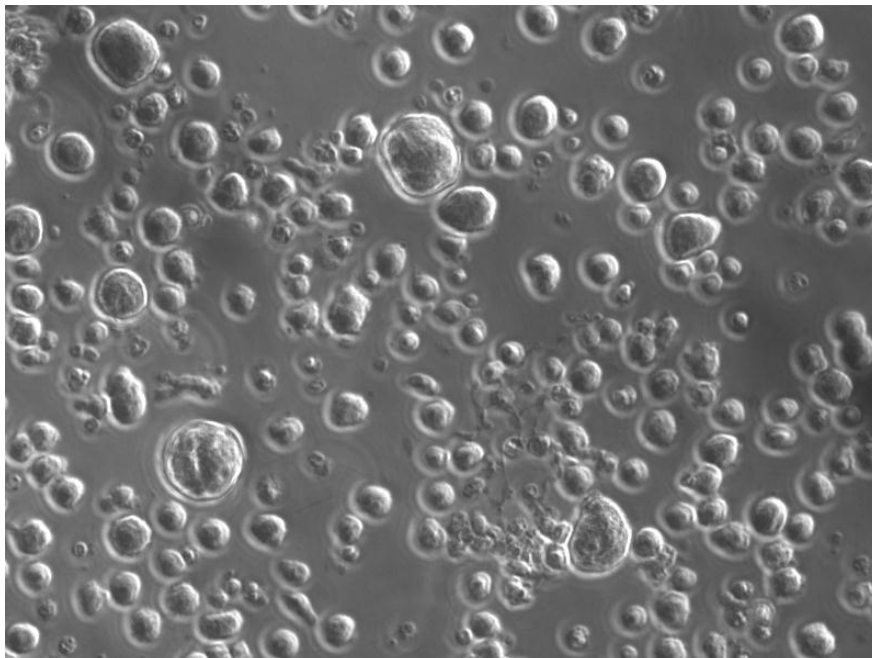
## 1.1 I MEGACARIOCITI

I megacariociti (MK) sono cellule ematopoietiche altamente specializzate deputate alla produzione ed al rilascio di piastrine (Hartwig et al, 2003), piccole cellule anucleate circolanti.

I MK sono cellule mieloidi che costituiscono circa l'1% della popolazione cellulare residente nel midollo osseo, sono inoltre presenti nel sangue periferico e nei polmoni (Ogawa, 1993).

I megacariociti maturi sono cellule con un diametro fino a 100 volte superiore rispetto alle altre cellule del sangue ( $> 100 \mu\text{m}$ ), poliploidi ( il contenuto nucleare può raggiungere lo stadio 128N) (Tomer, 2004), con un nucleo grande e multilobato ed un citoplasma ricco di granuli ( $\alpha$ -granuli, granuli densi, lisosomi e granuli microperossisomiali).

Ad uno stadio variabile dello sviluppo, solitamente allo stadio di otto nuclei, la replicazione e la crescita cellulare si arrestano per consentire la granulazione citoplasmatica e la produzione di estensioni citoplasmatiche, dette propiastriane, che in vivo culmina nel rilascio di piastrine mature attraverso l'endotelio dei sinusoidi midollari. (Figura 1)



**Figura 1:** L'immagine mostra megacariociti in coltura a diversi gradi di differenziamento.

## 1.2 LA MEGACARIOPOIESI

I megacariociti sono cellule labili che vengono continuamente sostituite con un processo chiamato emopoiesi.

La sede dell'emopoiesi umana evolve durante la gravidanza attraverso tre diversi stadi fino a raggiungere l'emopoiesi adulta. Il primo è lo stadio mesoblastico che ha luogo nel sacco vitellino a partire dal 19° giorno di gestazione e decresce fino a scomparire intorno alla 12° settimana. La seconda fase, lo stadio viscerale, ha luogo nel fegato e tra la 6° settimana e il 5-6° mese di gravidanza. Infine vi è lo stadio midollare che inizia intorno al 4° mese per raggiungere il suo apice alla 30° settimana di gestazione (Golde, 1991). Lo stadio midollare acquisisce tutte le caratteristiche dell'emopoiesi adulta in cui il midollo osseo sviluppa cavità sufficientemente ampie da sostenere la produzione dell'intera popolazione ematica (Patel et al, 2005). Nelle ultime fasi di vita fetale e nella vita adulta gli elementi corpuscolari del sangue vengono prodotti nel midollo osseo e nei tessuti linfoidei.

L'emopoiesi nell'adulto è tuttora un argomento controverso specialmente per quanto riguarda l'identificazione delle cellule progenitrici e la sede di sviluppo di tutte le cellule del sangue. Tuttavia, secondo la teoria attualmente accettata, detta monofiletica o unitaria, tutte le cellule ematopoietiche derivano da un'unica cellula capostipite, la cellula staminale ematopoietica (HSC) pluripotente CD34 positiva. Quest'ultima, a seconda di fattori locali ed umorali, come ormoni e fattori di crescita, è in grado di andare in contro al processo differenziativo perdendo progressivamente la staminalità e acquisendo un'elevata specificità funzionale.

La HSC può differenziare in progenitori multipotenti linfoidei, che si differenzieranno successivamente in linfociti, e progenitori multipotenti mieloidi, capostipiti di granulociti, monociti, eritrociti e megacariociti (Ogawa, 1993). In particolare dalla cellula staminale multipotente mieloide, si differenziano cinque diverse linee di progenitori commissionati: BFU-E (unità formanti grandi colonie eritroidi), BFU-MK (unità formanti grandi colonie megacariocitarie), CFU-GM (unità formanti piccole colonie monocita-neutrofile), CFU-Eo (piccole unità formanti colonie eosinofile) e CFU-Bas (unità formanti piccole colonie basofile). Successivamente le BFU-MK danno vita alle CFU-MK (unità formanti piccole colonie megacariocitarie) che tramite megacariocitopoiesi portano al differenziamento midollare di megacarioblasti con produzione finale di megacariociti.

Esistono diverse classificazioni per caratterizzare gli stadi del differenziamento in senso megacariocitario. Dal punto di vista morfologico nel midollo osseo si possono individuare 3 stadi:

- MK di stadio I: è il megacarioblasto che presenta un corredo cromosomico tetraploide (4n), ha un diametro di 10-50  $\mu\text{m}$  ed un citoplasma basofilo per la presenza di una grande quantità di ribosomi.
- MK di stadio II: è il promegacariocita che ha un diametro di 20-80  $\mu\text{m}$ , un citoplasma meno basofilo del megacarioblasto ed un citoplasma ricco in granulazioni.
- MK di stadio III: è il megacariocita maturo.

Tuttavia i progenitori dei megacariociti ed i megacariociti immaturi sono difficilmente identificabili sulla sola base morfologica. Per questo motivo per identificare e studiare il differenziamento dei megacariociti si ricorre ad antigeni di superficie differenzialmente espressi nei vari stadi.

Sono infatti noti alcuni marcatori di membrana che vengono persi o acquisiti durante le diverse fasi di maturazione del MK rappresentati principalmente dalle glicoproteine (GP) di membrana. Alcuni di questi marcatori sono specifici per le cellule di una data linea maturativa; altri variano la loro espressione in base allo stato di attivazione o differenziazione della cellula.

CD34 è l'antigene distribuito sulla superficie di cellule staminali totipotenti, cellule emopoietiche immature e sull'endotelio. Le cellule CD34<sup>+</sup> costituiscono circa l'1-3% di tutte le cellule mononucleate del midollo osseo, lo 0.1-0.2% delle mononucleate del sangue periferico e lo 0.8-1.2% di quelle di cordone ombelicale.

Il differenziamento in senso megacariocitario e piastrinico determina la perdita del CD34, la quale espressione diminuisce nei diversi stadi differenziativi fino ad essere persa quando inizia l'endomitosi.

Contemporaneamente si ha la progressiva comparsa di nuovi marcatori di superficie specifici per la funzionalità di queste cellule tra cui: CD41 e CD61 delle integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , CD42a, CD42b e CD51 della GPIbVIX (Majka et al, 2001; Poujol et al, 2002).

Il CD41, noto anche come GPIIb del complesso GPIIb-IIIa, è localizzato sulla membrana cellulare di megacariociti e piastrine ed insieme al CD61, presente sulla superficie di piastrine, megacariociti, cellule endoteliali, osteoclasti e cellule uterine, forma un eterodimero noto come GPIIb/IIIa, recettore per il fibrinogeno, fibronectina, vitronectina, fattore von Willebrand e trombospondina.

Il CD42 o GPIb è distribuito sui megacariociti e sulle piastrine come un complesso (CD42a con CD42b/c) associato alla GPV ed alla GPIX. Il CD42, costituito dunque dalle subunità CD42a/b/c,

media il legame di megacariociti e piastrine al fattore von Willebrand. La poliploidizzazione dei megacariociti è correlata all'espressione della GPIb, ed il complesso GPIb-V-IX regola la forma e le dimensioni delle piastrine attraverso la riorganizzazione del citoscheletro. L'espressione di questi marcatori di superficie varia durante la maturazione megacariocitaria; infatti la presenza della GPIIb-IIIa sui megacariociti precede l'espressione della glicoproteina GP Ib-V-IX, deputata al legame con il von Willebrand Factor (VWF) (den Dekker et al, 2003), sebbene quest'ultima abbia un'espressione significativa già in cellule diploidi e tetraploidi (Tomer, 2004).

Negli stadi terminali del differenziamento megacariocitario gioca inoltre un ruolo importante il recettore per il collagene, GPVI (Berlanga et al, 2000).

Infatti evidenze scientifiche dimostrano che l'espressione tardiva di GPVI dovrebbe prevenire l'attivazione di megacariociti immaturi, inoltre dovrebbe favorire la formazione di piastrine funzionali.

Caratteristica indispensabile nella maturazione del megacariocita è il raggiungimento di una condizione di poliploidia attraverso successivi processi di endomitosi. Infatti al termine della fase proliferativa si assiste ad un'interruzione prematura della mitosi dopo il completamento dell'anafase A. Dopo che è avvenuta la replicazione dei cromosomi e la rottura della membrana nucleare, il ciclo cellulare subisce un arresto nell'anafase B, impedendo la separazione dei due poli del fuso mitotico, e di conseguenza i processi di telofase e citochinesi.

La ricostituzione della membrana nucleare attorno ai cromosomi duplicati porta alla formazione di nuclei poliploidi, multilobati con un contenuto di DNA che varia da 4N a 128N per ogni megacariocita (Odell et al, 1970). Attualmente non è ancora nota la relazione che lega la ploidia all'attività dei megacariociti, sebbene sia fondamentale per la formazione di piastrine.

Successivamente al processo di endomitosi si assiste nel megacariocita ad una maturazione citoplasmatica. I MK aumentano notevolmente di dimensioni raggiungendo un diametro superiore a 100  $\mu\text{m}$ , si assiste inoltre alla produzione di proteine piastrino-specifiche (Long et al, 1982), ed alla formazione di organelli e sistemi di membrane che saranno successivamente suddivisi ed impacchettati all'interno delle piastrine neo formate.

Una delle caratteristiche più importanti del megacariocita maturo è la formazione di un sistema di demarcazione di membrana (DMS) che costituisce una complessa rete di cisterne appiattite e tubuli membranosi in diretto contatto con la membrana plasmatica cellulare. Inizialmente si riteneva che il DMS potesse essere implicato nella frammentazione del citoplasma in "distretti

piastrinici” che identificavano le piastrine nascenti (Shaklai et al, 1978). Tuttavia l’ipotesi attualmente più accreditata sulla funzione del DMS è che tale struttura possa servire da riserva di membrane per il rilascio piastrinico a partire da prolungamenti chiamati propiastrine (Italiano et al, 1999).

Nelle fasi che precedono questi eventi, si costituisce all’interno del megacariocita il sistema canalicolare aperto (OCS) la cui funzione è quella di agire come un sistema di canali da cui passano i granuli secretori dal citoplasma alle piastrine nascenti. Le diverse proteine sintetizzate durante la maturazione sono trasferite sulla superficie dei megacariociti o impacchettate all’interno degli  $\alpha$ -granuli, granuli densi, lisosomi e microperossisomi.

Gli  $\alpha$ -granuli e i granuli densi vengono sintetizzati dall’apparato del Golgi e sono presenti all’interno del megacariocita fin dai più precoci stadi maturativi (Youssefian et al, 2000), ma acquisiscono il loro contenuto solo in fasi successive tramite sintesi endogena ed uptake dal plasma grazie a recettori di membrana che ne mediano l’endocitosi o la pinocitosi. Solo in seguito all’arrivo di uno stimolo esterno, i granuli densi che sono i primi a fondersi con il sistema canalicolare aperto del megacariocita, indirizzano il loro contenuto all’interno dell’OCS fino alle piastrine nascenti.

Al completamento di questi processi maturativi e di sintesi, il megacariocita arresta sia la replicazione nucleare che la crescita cellulare: la cellula si trova nelle condizioni ottimali per la biogenesi delle piastrine (Italiano e Shivdasani 2003).



### 1.3 LA REGOLAZIONE DELLA MEGACARIOPOIESI E DELLA TROMBOPOIESI

Il processo di megacariocitopoiesi e di formazione delle piastrine avviene nel complesso microambiente del midollo osseo, dove giocano un ruolo chiave fattori chemotattici, citochine e ed interazioni adesive (Avecilla et al, 2004). I megacariociti sono inoltre in grado di rispondere ai cambiamenti nel numero di piastrine circolanti. Infatti in media vengono prodotte  $10^8$  piastrine al giorno, con un turnover di 8-9 giorni, tuttavia tale valore può aumentare fino a 10 volte se diminuisce il numero di trombociti in circolo (Kaushansky, 2005a).

Il principale fattore di crescita megacariocitario è la Trombopoietina (TPO) o ligando Mpl.

Il termine trombopoietina fu coniato nel 1958 per descrivere una generica sostanza umorale in grado di indurre un incremento del numero, della grandezza e della ploidia dei megacariociti, riscontrabile con un aumento della conta piastrinica, in animali trombocitopenici (Kelemen, 1970). L'identificazione di questo fattore di crescita e del suo gene è avvenuta nel 1994, consentendone la clonazione e la produzione in vitro della proteina ricombinante. La TPO è una glicoproteina di 332 aminoacidi che viene sintetizzata costitutivamente a livello epatico (Jelkmann, 2001) e dalle cellule stromali del midollo osseo come precursore di 353 aminoacidi (Guerriero et al, 1997).

Funzioni principali della TPO sono di supportare la sopravvivenza e l'espansione della HSC (Kaushansky, 2005b), ma soprattutto di promuovere la proliferazione, l'incremento delle dimensioni e della ploidia dei megacariociti e di favorirne il differenziamento sia precoce che terminale, sebbene il rilascio piastrinico ne sia poco influenzato (Choi et al, 1995a).

Studi di microscopia elettronica, condotti in colture a partire da midollo osseo murino, hanno evidenziato che la TPO è in grado di supportare, in assenza di altre citochine, il completo differenziamento e maturazione dei megacariociti con la formazione di granuli e delle membrane di demarcazione. In assenza di TPO, invece, questi frammenti non possono essere considerati territori piastrinici, poiché privi di organelli piastrino-specifici (Zucker-Franklin et al, 1996). Topi "knock-out" per il recettore della TPO mostrano una riduzione dell'85% della conta piastrinica, indicando l'importanza della TPO nella megacariopoiesi e nella trombopoiesi. (Gurney et al, 1994). La trombopoietina agisce tramite il legame e l'internalizzazione di un recettore di membrana chiamato c-Mpl, costitutivamente espresso dai tessuti ematopoietici. Il legame TPO-recettore si traduce in un'omodimerizzazione che permette di reclutare due chinasi appartenenti alla famiglia JAK, nello specifico JAK2, iniziando la cross-fosforilazione e quindi l'attivazione della via di

segnalazione intracellulare, che si traduce in segnali di sopravvivenza e proliferazione cellulare. L'importanza della segnalazione mediata da JAK2 è stata dimostrata in topi JAK2<sup>-/-</sup> che muoiono durante la vita intra-uterina a causa del fallimento dell'emopoiesi (Parganas et al. 1998).

Oltre alla trombopoietina esistono numerosi altri fattori di crescita che regolano la megacariopoiesi quali, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), stem cell factor (SCF), interleuchina 1 (IL-1), IL-3, IL-11, IL-6, eritropoietina (EPO). Questi sembrano avere un effetto simile alla TPO ma comunque secondari e dipendenti dalla presenza di quest'ultima.

In particolare l'IL-3, prodotta da linfociti T e mast cellule, può stimolare indipendentemente i primi stadi del differenziamento megacariocitario fino ad arrivare all'endomitosi (Williams, 1999). SCF invece agisce sulle cellule ematopoietiche primitive (McNiece et al, 1995) e, insieme a IL-6 e IL-11, regola diversi stadi del differenziamento megacariocitario in maniera TPO o IL-3 dipendente.

È stato tuttavia dimostrato che né la TPO né le altre citochine sono essenziali negli stadi finali della trombopoiesi *in vitro* (Choi et al, 1995b) e, anzi, studi *in vitro* hanno dimostrato che la TPO inibisce la formazione di propiastri in megacariociti umani.

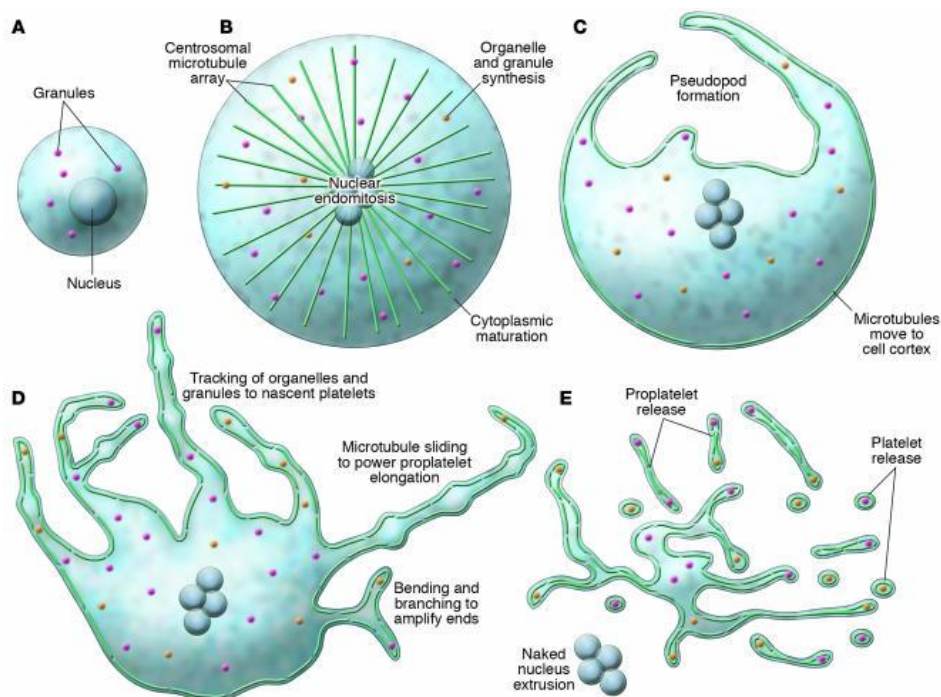
Oltre ai regolatori positivi della megacariopoiesi esisto anche fattori che inibiscono lo sviluppo in senso megacariocitario, tra cui il transforming growth factor  $\beta$ 1 (Kuter et al, 1992), PF4 e IL-4.

La megacariocitopoiesi e la trombocitopoiesi sono controllate dall'azione di fattori trascrizionali (TF), che formano complessi che regolano l'organizzazione della cromatina per attivare geni specifici dei megacariociti e reprimere l'espressione di geni specifici per altri tipi cellulari. Tra questi TF ricordiamo GATA-1, proteina che forma complessi con altri fattori trascrizionali tra cui FOG (friend of GATA), ETS e RUNX1 (acute myeloid leukaemia/runt-related TF 1) (Tsang et al, 1997) e che è coinvolta sia nel commissionamento megacariocitario ed eritroide sia nella proliferazione dei megacariociti. Uno degli eventi iniziali durante il differenziamento in senso megacariocitario ed eritrocitario è inoltre la downregolazione di PU.1, uno dei principali TF nel differenziamento mieloide (Nutt et al, 2005).

## 1.4 LA FORMAZIONE DELLE PIASTRINE

Il meccanismo mediante cui le piastrine vengono rilasciate dal megacariocita non è del tutto noto. Negli anni sono stati proposti diversi modelli tra cui la gemmazione, la frammentazione citoplasmatica e la formazione di propiastri, unica teoria ad oggi accettata.

Il termine propiastri è generalmente usato per descrivere lunghi e sottili processi citoplasmatici, simili a pseudopodi, che si dipartono dal megacariocita. Storicamente tali strutture erano già state descritte da Wright nel 1906 (Figura 2).



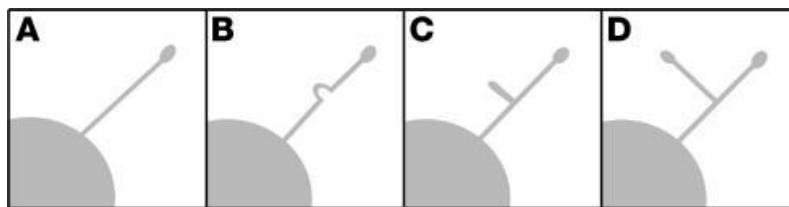
**Figura 2:** Meccanismi di megacariopoiesi e piastrinogenesi (Italiano et al, 2005).

La teoria rudimentale della formazione delle propiastri è stata sviluppata da Becker e DeBruyn nel 1976. Oggi tale teoria è stata confermata e migliorata da studi sia *in vitro* (Schmitt et al, 2001), grazie alla scoperta della trombopoietina, che *in vivo* (Choi et al, 1995b), in diversi modelli animali quali topo, ratto, cani, e nell'uomo.

Studi condotti da Junt et al. (2007), sulla trombopoiesi *in vivo* su topi transgenici i cui megacariociti esprimono la proteina fluorescente EYFP, hanno permesso di descrivere l'esatto processo di generazione propiastri all'interno midollo osseo e di confermare che il modello *in vitro* non è frutto di un artificio, ma è l'esatta riproduzione del processo fisiologico.

Le propiastriane sono generate dalla riorganizzazione del sistema membranoso interno di megacariociti maturi e mediano la generazione delle vere e proprie piastrine. La formazione delle propiastriane è preceduta e accompagnata da caratteristiche modificazioni conformazionali dovute alla riorganizzazione dell'actina e dei microtubuli del citoscheletro. Tale processo avviene dunque solo successivamente alla maturazione del megacariocita e dura poche ore.

L'assemblaggio delle piastrine richiede complessi processi di interconversione del citoplasma nei lunghi prolungamenti (100-500  $\mu\text{m}$ ) dalle quali terminazioni si formano e vengono successivamente rilasciate le singole piastrine. La prima fase inizia con la formazione in un singolo sito della cellula di uno o più pseudopodi, che in 4-10 ore continuano ad allungarsi e ad estendere propiastriane con un diametro di 2-4  $\mu\text{m}$  (Figura 3).



**Figura 3:** *Meccanismo di amplificazione del numero di propiastriane (Italiano et al, 2007).*

Il processo di amplificazione del numero di propiastriane è dinamico ed in esso giocano un ruolo di rilevanza fondamentale la tubulina nell'allungamento, e l'actina nella formazione delle terminazioni della propiastriana. Le propiastriane sono modificate casualmente con la formazione di ramificazioni e rigonfiamenti, ciascun simile per dimensioni alle piastrine, che dà loro l'immagine di biglie connesse alla cellula tramite un sottile filamento di citoplasma (Italiano et al, 2007).

La generazione delle propiastriane successive prosegue vicino o al livello del sito di formazione iniziale con una continua diffusione di ulteriori prolungamenti fino alla completa conversione del citoplasma del megacariocita in un'estesa rete di propiastriane interconnesse tra loro (Italiano et al, 1999). Il nucleo multilobato del corpo cellulare è compresso in una massa centrale, circondato da poco citoplasma che può andare incontro a degradazione da parte del sistema fagocitario dei capillari polmonari o estrusione (Patel et al, 2005).

Le piastrine formatesi alle estremità delle propiastriane devono accumulare organelli e granuli, che migrano lungo i microtubuli dal corpo cellulare alle propiastriane dove, muovendosi bidirezionalmente, vengono catturati dalle piastrine nascenti (Richardson et al, 2005).

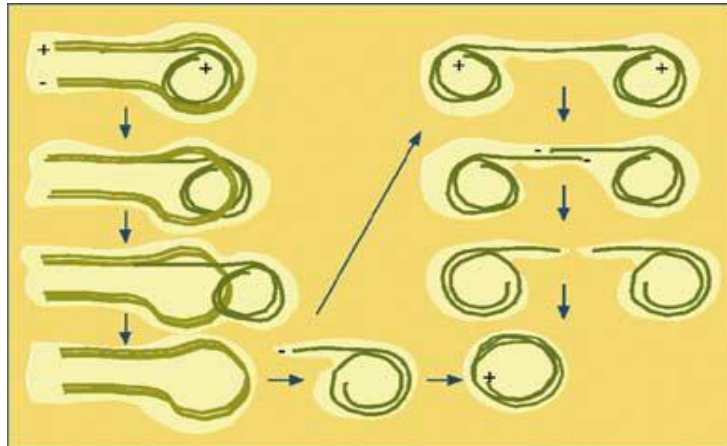
In tale processo di migrazione giocano un ruolo cruciale due proteine motrici: la dineina e la chinesina. Il movimento di organelli e granuli sembra quindi dovuto sia al loro stesso spostamento all'interno dei microtubuli sia, indirettamente, allo slittamento dei microtubuli su se stessi.

Sebbene la struttura delle propiastriane sia ben chiara, ancora oggi è poco conosciuto il segnale che innesca e regola la formazione delle estroflessioni citoplasmatiche, specialmente nell'uomo.

Sembra esistere un gradiente di megacariociti nelle varie tappe differenziative a livello dei sinusoidi del midollo osseo (Tavassoli et al, 1989): le cellule a differenziazione completa migrano in prossimità delle cellule endoteliali dei sinusoidi.

Recenti studi hanno mostrato come la chemochina SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) ed il fattore di crescita FGF-4 (fibroblast growth factor-4) sono necessari al reclutamento di megacariociti maturi a livello delle cellule endoteliali dei sinusoidi, promuovendo, dunque, l'interazione dei progenitori con la nicchia vascolare midollare (Avecilla et al, 2004); infatti entrambi tali fattori promuovono l'espressione di molecole di adesione come VLA-1 nel megacariocita e di VCAM-1 a livello dell'endotelio (Avraham, 1994). Inoltre FGF-4 aumenta l'adesione dei progenitori dei megacariociti alla nicchia vascolare, mentre, SDF1 è un potente fattore chemotattico per la migrazione transendoteliale dei megacariociti maturi.

Una volta in prossimità del sinusoidi, le propiastriane attraversano l'endotelio rilasciando in circolo le piastrine. Rimane tuttavia ancora da chiarire come avvenga il rilascio delle piastrine e perché vengano preferenzialmente rilasciati i processi citoplasmatici nel lume del sinusoidi che successivamente vengono frammentati in singole piastrine nel circolo sanguigno. È stato proposto che nel rilascio delle piastrine dalla propiastriana sia importante lo slittamento dei microtubuli che portano all'arrotolamento del microtubulo su se stesso (Figura 4).



**Figura 4:** *Ipotetico meccanismo di rilascio delle piastrine dalle terminazioni delle propiastri.*

*(Hartwig et al, 2003)*

Il processo di formazione delle piastrine presenta inoltre delle caratteristiche comuni al processo di apoptosi. Diversi studi hanno indagato come l'apoptosi sia un processo di fondamentale importanza nella formazione di propiastri, nell'assemblaggio e nel rilascio delle piastrine. Inoltre l'apoptosi è responsabile della distruzione del nucleo nei megacariociti senescenti (Gordge, 2005) ed è marcata nei megacariociti maturi rispetto alle cellule immature (Falcieri et al, 2000).

Nei megacariociti, infatti, sono stati individuati diversi fattori pro e anti apoptotici (Kaluzhny et al, 2004). I fattori antiapoptotici, quali Bcl-2 e Bcl-XL, sono espressi nelle fasi precoci della megacariopoiesi e se overespressi inibiscono la formazione di propiastri (de Botton et al, 2002). Inoltre Bcl-2 è assente nelle piastrine mature, mentre Bcl-XL non è espresso nei megacariociti senescenti (Sanz et al, 2001), supportando l'ipotesi secondo cui l'apoptosi rivesta un ruolo cruciale nei megacariociti maturi. Per quanto riguarda invece i fattori pro apoptotici, come le caspasi 3, 9 e 12, le proteine SMAD e il transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (Kim et al, 2002), essi sono attivi nei megacariociti terminalmente differenziati e nell'assemblaggio delle piastrine.

È interessante andare a valutare come tali fattori apoptotici varino in megacariociti e piastrine maturi (Clarke et al, 2003). Per esempio le caspasi 3, 9, 12 sono attive nei megacariociti terminalmente differenziati, mentre nelle piastrine solo la caspasi 3 è presente (Brown et al, 2000). Tali dati, dunque, supportano l'ipotesi di un meccanismo differenziale per la morte programmata in piastrine e megacariociti (Kerrigan et al, 2004).

## 1.5 LE PIASTRINE

Le piastrine sono piccoli frammenti cellulari derivanti dai megacariociti da cui acquisiscono quasi tutte le caratteristiche strutturali. Le piastrine ricoprono un ruolo essenziale nei meccanismi di emostasi primaria, coagulazione sanguigna; intervengono inoltre nei processi infiammatori e nella risposta immunitaria mediante un complesso sistema di attività biochimiche e molecolari. Esse sono presenti ad elevate concentrazioni plasmatiche:  $3 \times 10^8$  piastrine/ml ed hanno un'emivita di 7 giorni.

Al microscopio ottico appaiono come piccole cellule di 3-5  $\mu\text{m}$  di diametro, anucleate, ovoidali o tondeggianti con un citoplasma pallido e grigio-bluastrò omogeneamente punteggiato da granuli rosso-purpurei. Dato che non possiedono DNA genomico, le piastrine non producono nuovo RNA messaggero a parte quello di derivazione mitocondriale. Possiedono tuttavia mRNA e pre-mRNA del megacariocita di origine che sottopongono ad un processo di splicing e che vengono successivamente tradotti in proteina: nel citoplasma piastrinico sono presenti componenti funzionali dello spliceosoma che vengono attivati in modo segnale-dipendente e proteine necessarie per la sintesi proteica (Denis et al 2005).

## 1.6 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI

Gli estrogeni sono ormoni steroidei in grado di regolare processi biologici come la proliferazione cellulare, la morfogenesi, il differenziamento cellulare, l'apoptosi e l'omeostasi. Come tutti gli ormoni, per esplicare la loro azione devono riconoscere e legare recettori specifici che a loro volta trasmettono l'informazione ad effettori.

Gli estrogeni sono in grado di diffondere attraverso la membrana plasmatica e legare recettori, facenti parte di una superfamiglia di recettori nucleari che include i recettori per gli steroidi, per l'ormone tiroideo, per l'acido retinoico, per la vitamina D, che agiscono come fattori di trascrizione ligando-dipendenti per controllare l'espressione di geni target.

I due recettori degli estrogeni, denominati ER $\alpha$  e ER $\beta$ , hanno una struttura molto simile, ma non sono isoforme infatti sono codificate da due geni diversi localizzati su cromosomi diversi, rispettivamente 6q25.1 e 14q23.2.

Inoltre anche la loro localizzazione differisce, infatti ER $\alpha$  è maggiormente espresso nella ghiandola mammaria, nell'utero e nella vagina, mentre ER $\beta$  è presente in modo ubiquitario nel sistema nervoso centrale, nel sistema cardiovascolare, nel sistema immunitario, nel tratto urogenitale, nel tratto gastrointestinale, nel rene e nel polmone (Cheskis et al, 2007).

Entrambi i recettori possiedono una struttura conservata con tre principali regioni funzionali:

- un dominio di transattivazione N-terminale (AF-1)
- un dominio centrale di legame del DNA (DBD), che contiene una regione P-box responsabile del legame a sequenze 5'-AGGTCA sul DNA e coinvolta nella dimerizzazione del recettore
- un dominio C-terminale di legame dell'ormone (HBD).

A quest'ultimo dominio sono inoltre associate una regione di transattivazione (AF-2), l'interfaccia di dimerizzazione. Inoltre alla porzione C-terminale più distale è associata la funzione di regolazione dell'attività di regolazione della trascrizione (Koide et al, 2007).

Il legame dell'estrogeno al recettore induce una modificazione conformazionale specifica che risulta nella dissociazione del recettore da un complesso con una proteina chaperone, nella successiva dimerizzazione e nel legame del dimero recettoriale a specifici elementi di risposta all'estrogeno (ERE= Estrogen Response Element) situati nella regione regolatoria 5' dei geni bersaglio dell'ormone. ER legato al promotore di tali geni, grazie all'interazione coi domini AF-1 e



AF-2, recluta coattivatori della trascrizione e permette l'assemblaggio del complesso di inizio della trascrizione genica (McKenna et al, 2002).

Tale processo di attivazione della trascrizione ER-mediato richiede 30-60 minuti ed è noto come azione classica o genomica degli estrogeni (Mavanathi 2006).

Già più di sessant'anni fa è stata osservata la capacità degli estrogeni di mediare anche risposte cellulari rapide, indipendenti dalla sintesi di nuovo RNA messaggero e di proteine. Tale meccanismo è stato definito non-genomico o rapido, è insensibile a inibitori della trascrizione e della traduzione, e comprende la generazione di secondi messaggeri come cAMP, calcio e ossido nitrico e l'attivazione di chinasi come cambiamenti nell'attività dell'adenilato ciclasi, delle MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), della fosfatidilinositolo 3-chinasi, di Akt e di Src. (Hall et al, 2001; Levin, 2001) .

Gli effetti rapidi degli estrogeni possono essere mediati dai recettori classici (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) o mediati da altri recettori di membrana.

Una delle prove dell'esistenza di un recettore per gli estrogeni nella membrana plasmatica distinto dai recettori classici è l'attivazione delle MAPKs ERK1 ed ERK2 ad opera del 17 $\beta$ -estradiolo in cellule di carcinoma mammario che mancano sia di ER $\alpha$  sia di ER $\beta$ . In questo modello, l'estrogeno interagisce con un recettore a sette domini transmembrana associato a proteine G (GPCR), il GPR30, localizzato sul reticolo endoplasmatico. In seguito all'interazione ligando-recettore la subunità  $\alpha$  si dissocia dal complesso eterotrimerico G $\alpha\beta\gamma$ . Il segnale mediato dal dimero G $\beta\gamma$  è trasmesso attraverso tirosin chinasi della famiglia di Src, portando alla fosforilazione di Shc ed alla successiva attivazione Ras-dipendente di ERK1 ed ERK2. La stimolazione del recettore da parte dell'estrogeno risulta anche nella rapida attivazione di un segnale intracellulare, probabilmente via Src, che stimola l'attività extracellulare di una metalloproteasi transmembrana. Questo determina il processamento extracellulare dell'epidermal growth factor (EGF) legato all'eparansolfato: L'EGF rilasciato interagisce con un ectodominio del recettore per l'EGF scatenando una via di segnalazione intracellulare che culmina con l'attivazione di ERK1 ed ERK2 (Filardo et al., 2002).

Evidenze sperimentali su cellule di carcinoma mammario hanno messo in evidenza che il GPR30 agisce indipendentemente da ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Filardo et al, 2000). Inoltre in cellule SKBR3 umane, che non esprimono i recettori classici, si ha una risposta agli stimoli estrogenici rapida mediata dal GPR30 (Filardo et al, 2005).

Ad oggi tuttavia non è ancora nota quale sia la relazione tra il GPR30 e i recettori classici degli estrogeni, è possibile che l'azione rapida degli estrogeni sia mediata da una complessa rete di proteine che comprendono ER $\alpha$ , ER $\beta$  e recettori non convenzionali per gli estrogeni, come il GPR30.

Per quanto riguarda invece le azioni rapide degli estrogeni mediate dai recettori classici, i primi studi sono stati condotti utilizzando tecniche biochimiche e morfologiche e di immunfluorescenza (Pappas et al, 1995). Studi di transfezione in cellule CHO hanno dimostrato che un singolo trascritto può codificare sia per il recettore nucleare sia per quello legato alla membrana (Razandi et al, 1999). ER $\alpha$  e ER $\beta$  inoltre sono dinamici, in quanto possono spostarsi dal nucleo alla membrana (Russell et al, 2000), tuttavia esplicano la loro funzione soprattutto a livello nucleare.

E' stato dimostrato che le caveole, grazie alla presenza della caveolina, una fosfoproteina transmembrana che forma una struttura su cui molte molecole segnale si possono assemblare generando dei complessi di segnalazione, giocano un ruolo importante nella trasduzione del segnale compresa quella regolata dagli estrogeni (Lu et al., 2001).

È stato inoltre riportato che ER $\alpha$  può essere localizzato sulla membrana cellulare insieme alla proteina adattatrice Shc, infatti la regione N- terminale di ER $\alpha$  può interagire direttamente con il dominio SH2 di Shc (Song et al, 2002).

Per quanto riguarda ER $\beta$  la maggior parte degli studi condotti sono relativi alla prima forma clonata, ER $\beta$ 1, proteina di 530 amminoacidi codificata dai primi 8 esoni del gene. Tuttavia, studi di sequenziamento hanno evidenziato l'esistenza di diverse isoforme ottenute da splicing alternativo, tra cui: ER $\beta$ 2 (o ER $\beta$ cx), ER $\beta$ 3, ER $\beta$ 4, ER $\beta$ 5 e ER $\beta$ del2.

Studi di allineamento della sequenza amminoacidica delle diverse isoforme hanno rivelato che esse differiscono tra loro nel dominio C-terminale dove è situato il dominio di legame al ligando (Moore et al, 1998) e che tale dominio ha una lunghezza minore ed una diversa organizzazione spaziale rispetto a ER $\beta$ 1.

Per comprendere le proprietà funzionali delle diverse isoforme, i loro trascritti sono stati espressi in cellule di rene embrionale umano (HEK293) e nel lievito, entrambi mancanti di ER $\beta$  endogeno (Leung et al, 2006). Tale studio ha evidenziato che ER $\beta$ 4 e ER $\beta$ 5 legano l'estradiolo con minor affinità rispetto a ER $\beta$ 1 e che, a differenza di ER $\beta$ 1, le varie isoforme da sole non sarebbero in grado di transattivare un promotore guidato da un elemento di risposta agli estrogeni in presenza di estradiolo. Tali dati suggeriscono che ER $\beta$ 1 sia l'unica isoforma pienamente funzionale del

recettore, essa può dimerizzare con le altre isoforme sotto stimolazione estrogenica con modulazione del suo potere transattivatorio.

## 2. SCOPO DEL LAVORO

Gli eventi responsabili della maturazione dei MK, della formazione di proplastrine e del rilascio di piastrine sono eventi ad oggi poco caratterizzati da un punto di vista molecolare. È noto che il processo di differenziamento megacariocitario e la variazione di espressione genica ad esso associata sono modulati da fattori locali ed umorali, come ormoni e fattori di crescita.

Un numero crescente di evidenze sperimentali mette in luce un importante ruolo degli estrogeni nel regolare i meccanismi di megacariocitopoiesi e piastrinogenesi.

Infatti è stato riportato che elevate concentrazioni di estrogeni sono in grado di promuovere un iniziale aumento del numero di megacariociti nel topo (Perry et al, 2000) e che nel midollo di donne in menopausa sottoposte a terapia estrogenica sostitutiva si osserva un incremento della popolazione megacariocitaria (Bord et al, 2000). Inoltre studi *in vitro* su cellule staminali embrionali murine hanno dimostrato che i megacariociti sono in grado di sintetizzare estradiolo, il quale a sua volta promuove la formazione delle proplastrine e che tale meccanismo è accentuato in presenza di estrogeno (Nagata et al, 2003).

Recenti studi hanno dimostrato che i megacariociti e le piastrine esprimono i recettori classici per gli estrogeni (Tarantino et al, 1994 ; Khetawat et al, 2000). È stato infatti riportato che gli effetti rapidi del 17 $\beta$ -estradiolo in piastrine umane sono mediati da ER $\beta$ , che recluta ed attiva la tirosin chinasi Src (Moro et al, 2005). Inoltre nel nostro laboratorio è stato dimostrato che i raft lipidici, piccole piattaforme di membrana altamente organizzate e arricchite in glicosfingolipidi, fosfolipidi saturi e colesterolo, sono essenziali sia nel potenziamento dell'aggregazione piastrinica 17- $\beta$ -estradiolo dipendente indotta da trombina sia nella fosforilazione di Src indotta da tale ormone. Infatti il 17- $\beta$ -estradiolo causa una traslocazione reversibile di ER $\beta$  sui raft e promuove il richiamo ed attivazione di Src e Pyk a livello delle membrane dei raft (Reineri et al, 2007).

Studi *in vitro* condotti da Bord et al (Bord et al, 2004) hanno dimostrato che gli estrogeni promuovono la proliferazione, il differenziamento e la maturazione dei megacariociti e che l'espressione dei recettori classici per gli estrogeni è modulata durante la megacariopoiesi sotto stimolazione estrogenica. In particolare è stato riportato che il trattamento con estrogeni causa un aumento precoce dell'espressione del trascritto e della proteina di ER $\alpha$  nei megacariociti, ma che essi non sono rilevabili nei MK maturi (Khetawat et al, 2000). Inoltre è stato osservato un aumento

significativo di ER $\beta$  negli stadi terminali del differenziamento megacariocitario sotto stimolazione estrogenica.

Ad oggi tuttavia nessuno studio si è occupato di valutare quale possa essere il ruolo della segnalazione non genomica estrogenica nel differenziamento megacariocitario.

In particolare non è ancora nota quale sia la relazione tra il GPR30 e i recettori classici degli estrogeni. Inoltre le diverse isoforme di ER $\beta$  potrebbero giocare un ruolo importante nella segnalazione megacariocitaria rapida, piuttosto che nel meglio conosciuto meccanismo genomico.

A tale scopo abbiamo quindi deciso di indagare l'espressione di ER $\alpha$ , delle isoforme di ER $\beta$  e del GPR30 durante il differenziamento megacariocitario e nelle piastrine.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 LINEE CELLULARI E COLTURE

Le **HEL** sono cellule eritroleucemiche in grado di differenziare verso la linea megacariocitica. Esse crescono in sospensione e vengono coltivate in terreno RPMI (Roswell Park Memorial Institute) al 15% di siero inattivato (30 minuti a 56 °C), supplementato con una miscela di antibiotici ed antimicotici. La crescita avviene a 37°C, in atmosfera contenente il 5% di CO<sub>2</sub>. La coltura è considerata a confluenza quando la concentrazione cellulare è di 1x10<sup>6</sup> cellule/ml. Ogni volta che si espandono la densità nelle nuove fiasche deve essere mantenuta tra 2 x 10<sup>5</sup> e 5 x 10<sup>5</sup> cellule/ml. Per il passaggio della coltura, le cellule vengono trasferite in provette di polipropilene e centrifugate a temperatura ambiente per 6 minuti a 1300 rpm. Al termine della centrifugazione il surnatante viene eliminato, le cellule vengono lavate in PBS, ricentrifugate e risospese in RPMI di fresca preparazione al 15% di FBS inattivato.

Le **MEG01** sono cellule leucemiche della linea megacarioblastica. Esse crescono per lo più in sospensione, hanno una morfologia mista e alcune sono aderenti. Vengono coltivate in terreno RPMI al 10% di siero inattivato, supplementato con antibiotici e antimicotici. La crescita avviene a 37°C, in atmosfera contenente il 5% di CO<sub>2</sub>. Ogni volta che si espandono la densità nelle nuove fiasche deve essere mantenuta tra 2 x 10<sup>5</sup> e 4 x 10<sup>5</sup> cellule/ml. Per il passaggio della coltura, le cellule vengono tripsinate, trasferite in provette di polipropilene e centrifugate a temperatura ambiente per 6 minuti a 1300 rpm. Al termine della centrifugazione il surnatante viene eliminato, le cellule vengono lavate con PBS, centrifugate e risospese in RPMI di fresca preparazione al 10% di FBS inattivato.

Campioni da 1x10<sup>6</sup> cellule/ml sia di HEL che di MEG01 sono stati stimolati in terreno RPMI al 10% di FBS inattivato addizionato con PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) 100 nM per 72 ore a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>.

Terminata l'incubazione l'avvenuto differenziamento in entrambe le linee cellulari è stato studiato valutando l'espressione del GPIIb/IIIa. A tale scopo è stato usato un anticorpo specifico per la subunità  $\alpha$  (CD41) coniugato con il fluorocromo FITC (Ansell) che, eccitato, emette fluorescenza nel verde (lunghezze d'onda superiori a 520 nm). I campioni sono stati incubati per 15 minuti al buio, lavati in PBS, centrifugati per 5 minuti a 1300 rpm, risospesi in 400  $\mu$ l di ioduro di propidio 1  $\mu$ g/ml ed analizzati usando il citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson).

### **3.2 ESTRAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI DA SANGUE DI CORONE OMBELICALE E GENERAZIONE *IN VITRO* DI MEGACARIOCITI**

Il sangue di cordone ombelicale (CB) è stato ottenuto da donatori sani che avevano precedentemente firmato il consenso informato. I CB sono stati raccolti presso l'Ospedale Maggiore della Carità di Novara.

Il metodo di isolamento delle cellule staminali CD34 positive da sangue di cordone ombelicale e di differenziamento in senso megacariocitario è stato appreso nel Laboratorio di Biochimica della Professoressa Balduini di Pavia.

Le cellule mononucleate sono state separate stratificando il sangue, diluito 1:1 in PBS, su Lympholyte (densità < 1077 g/ml, Cedarlane) e centrifugando per 30 minuti a 450 x g a 20°C senza freno. Le cellule ottenute sono state successivamente lavate con PBS e risospese in terreno RPMI supplementato di antibiotici e antimicotici. Le cellule sono state quindi incubate per 30 minuti a 37° C in atmosfera contenente il 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule non aderenti sono state lavate in PBS. Successivamente le staminali CD34 positive sono state separate con la tecnica delle biglie immunomagnetiche (Miltenyi Biotec) in base al protocollo dell'azienda produttrice.

Le cellule isolate sono state messe in coltura ad una concentrazione di 1 x 10<sup>6</sup> cells/ml in terreno StemSpan SFEM (StemCell Technologies Inc) contenente 10 ng/ml di TPO, di interleuchina (IL) 6 e di IL11 (PeproTech EC Ltd). Le cellule sono state mantenute in coltura a 37° C in atmosfera contenente il 5% di CO<sub>2</sub> per 13 giorni, sostituendo il terreno al terzo, al settimo ed al decimo giorno. Al termine dei 13 giorni le cellule differenziate CD61 positive sono state isolate con la tecnica delle biglie immunomagnetiche (Miltenyi Biotec) in base al protocollo dell'azienda produttrice.

### **3.3 ISOLAMENTO DELLE PIASTRINE**

Il sangue (40 ml) è stato prelevato da donatori volontari sani di età compresa tra 20 e 35 anni utilizzando come anticoagulante 4 ml di ACD (130 mM acido citrico, 152 mM sodio citrato, 112 mM glucosio) contenente EDTA 20 mM.

Il plasma ricco in piastrine (PRP) è stato ottenuto tramite centrifugazione a 156 x g per 15 minuti senza freno ed è stato addizionato di EDTA in concentrazione finale 2 mM e di PGE-1 in concentrazione finale 1 µM.

Il PRP è stato centrifugato a 700 x g per 13 minuti senza freno. Le piastrine sono state recuperate e risospese in tampone HEPES/NaCl (10 mM HEPES, 0,85% p/v NaCl pH 7,4) contenente EDTA in concentrazione 2 mM.

I leucociti contaminanti sono stati in parte eliminati tramite centrifugazione a 94 x g per 6 minuti senza freno. Le piastrine sono state contate.

La sospensione piastrinica è stata dispensata su un gradiente discontinuo di Optiprep (Progen) in tampone HEPES/NaCl. Il gradiente è stato successivamente centrifugato a 300 x g per 20 minuti senza freno per separare le piastrine dai leucociti rimasti e da altri contaminanti (Birschmann et al. 2008).

La frazione di gradiente contenente le piastrine è stata recuperata e sono state nuovamente contate le piastrine.

Il pellet piastrinico è stato ottenuto tramite centrifugazione a 700 x g per 13 minuti senza freno.

### **3.4 ESTRAZIONE DELL'RNA, QUANTIFICAZIONE E RETROTRASCRIZIONE**

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit RNAqueous (Ambion Inc.), secondo il protocollo fornito dall'azienda produttrice. Successivamente l'RNA è stato quantificato mediante il fluorimetro Qubit (Invitrogen).

Nell'RNA totale estratto dai megacariociti è stata valutata l'eventuale contaminazione di materiale genomico mediante PCR per S15. Tale reazione è stata condotta utilizzando GoTaq master mix (Promega) con le seguenti condizioni di amplificazione: iniziale ciclo di denaturazione a 94° C per 3 minuti seguito da 30 cicli a 94° C per 30 secondi, 55° C per 30 secondi per permettere



l'appaiamento dei primers e 72° C per 1 minuto seguiti da un ciclo di estensione finale a 72° C per 3 minuti. I campioni positivi sono stati trattati con DNAsi I (Ambion Inc.).

500 ng di RNA sono stati retrotrascritti utilizzando l'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) in un volume finale di 20 µl secondo il protocollo fornito dall'azienda produttrice.

Successivamente è stata valutata l'assenza di contaminazione leucocitaria nelle piastrine mediante PCR. Tale reazione è stata effettuata utilizzando GoTaq master mix (Promega) con le seguenti condizioni di amplificazione: iniziale ciclo di denaturazione a 94° C per 5 minuti seguito da 30-40 cicli a 94° C per 30 secondi, temperatura di appaiamento per 30 secondi e 72° C per 1 minuto seguiti da un ciclo di estensione finale a 72° C per 3 minuti. A tale scopo sono stati utilizzati i primers per la GAPDH come controllo positivo, per il fattore di Von Willebrand, specifico delle piastrine, e per il CD45, antigene specifico dei leuciti (tabella 1).

	<b>PRIMER</b>	<b>AMPLICONE</b>	<b>T. APPAIAMENTO</b>	<b>CICLI</b>
<b>GAPDH</b>	s 5'-TCCCTGAGCTGAACGGGAAG-3' as 5'-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3'	217 bp	55°C	30
<b>VWF</b>	s 5'-TGCTGAGCCTTGTGGACGTCAT-3' as 5'-TCTGGCTGGCAAGTCACGGTGT-3'	451 bp	57°C	40
<b>CD45</b>	s 5'-CTGGAGGACACAGCACATTG-3' as 5'-GTCCCTGAGCAGCAATCATC-3'	245 bp	55°C	30

### 3.5 REAL TIME PCR

La real-time PCR è stata condotta con lo strumento ABI Prism Sequence Detection System 7000 (Applied Biosystem) in un volume finale di reazione di 20  $\mu$ l contenente Taqman gene expression master mix 1X (Applied Biosystem), primer senso e antisenso 900 nM ciascuno e sonda taqman 250 nM specifici per il trascritto (Applied Biosystem), 4  $\mu$ l cDNA (della opportuna diluizione seriale) e acqua sterile (quanto basta). E' stato utilizzato il seguente protocollo di amplificazione: 95° C per 10 minuti, 40 cicli di 95° C per 15 secondi, 50° C per 2 minuti e 60° C per 1 minuto.

Sono stati utilizzati saggi TaqMan specifici per GAPDH, ER $\alpha$  e GPR30 (Applied Biosystem)

Inoltre la real-time PCR è stata condotta usando primers e probes specifici per le diverse isoforme di ER $\beta$  disegnati nel nostro laboratorio, variando solo le concentrazioni dei primer senso: 100 nM per ER $\beta$ 1e ER $\beta$ 4 e ER $\beta$ 5 e dei primer antisenso: 450 nM per ER $\beta$ 1e ER $\beta$ 4 e 900 nM per ER $\beta$ 5.

## 4. RISULTATI

Ad oggi pochi studi hanno cercato di comprendere quale sia il ruolo degli estrogeni nel differenziamento dei megacariociti, nella formazione delle piastrine e nel rilascio delle piastrine mature.

In questo primo anno di Dottorato sono quindi andata ad indagare il profilo di espressione di ER $\alpha$ , ER $\beta$  e del GPR30 durante il differenziamento megacariocitario.

### 4.1 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI NEL DIFFERENZIAMENTO DI LINEE MEGACARIOBLASTICHE

Primo obiettivo del progetto era di valutare la presenza e l'espressione di ER $\alpha$ , di ER $\beta$ , e di GPR30 in cellule MEG01 ed HEL.

In un primo momento abbiamo cercato di valutare la presenza delle proteine di interesse tramite SDS-Page e Western blot. Tuttavia gli anticorpi disponibili in commercio, soprattutto per quanto riguarda il GPR30, presentano un elevato grado di aspecificità e l'analisi risultava piuttosto difficoltosa.

Siamo quindi passati a valutare l'espressione genica di ER $\alpha$  alcune isoforme di ER $\beta$  e di GPR30 nelle HEL e nelle MEG01 differenziate e non.

A tale scopo le cellule sono state coltivate in terreno RPMI al 10% di siero inattivato in presenza ed in assenza di PMA 100 nM che induce il differenziamento in senso megacariocitico di entrambe le linee cellulari analizzate.

Terminata l'incubazione l'avvenuto differenziamento di HEL e MEG01 è stato studiato valutando l'espressione della subunità  $\alpha$  (CD41) della glicoproteina IIb/IIIa, proteina altamente espressa nelle piastrine (dati non mostrati). Essa rappresenta infatti il recettore per il fibrinogeno ed è un marker di differenziamento precoce verso la linea megacariocitaria (Nurden et al, 1997). La GPIIb/IIIa è costituita da una catena  $\alpha$  ed una catena  $\beta$  e può presentarsi in una forma chiusa inattiva ed in una conformazione aperta e quindi attiva.

Nelle cellule HEL e MEG01 tale glicoproteina è esposta sulla membrana, ma la sua espressione aumentata fortemente se le cellule vengono stimolate a differenziare verso la linea megacariocitaria.

Successivamente è stato estratto l'RNA totale sia dalle cellule non differenziate che da quelle differenziate ed il cDNA derivato da retrotrascrizione è stato usato in real-time PCR per amplificare i trascritti di ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 4 e GPR30.

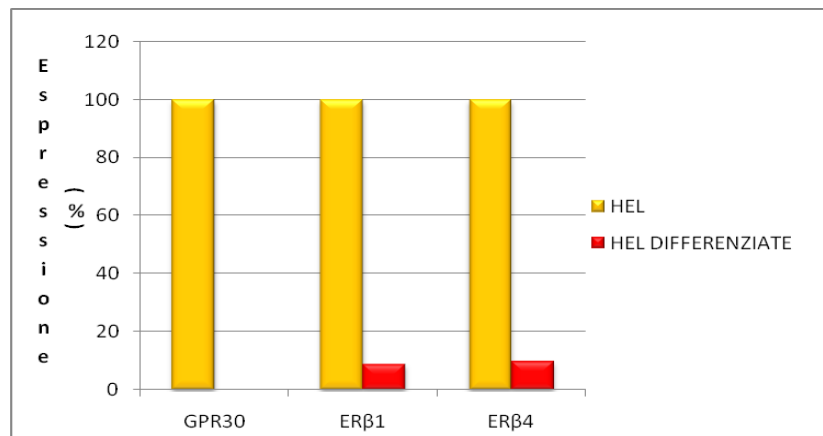
La presenza dei trascritti è stata inizialmente valutata nelle cellule non differenziate in base ai valori dei rispettivi  $\Delta$ Ct (ciclo soglia del trascritto in analisi meno ciclo soglia del controllo endogeno GAPDH). Nelle cellule HEL i  $\Delta$ Ct di GPR30, ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4 sono rispettivamente 15, 7.3, 7.4, mentre nelle MEG01 sono 14, 9.3, 9.5. Il trascritto ER $\alpha$  risulta non essere espresso in entrambe le linee cellulari analizzate (dati non mostrati).

Tali dati evidenziano una differenza di quantità dei recettori analizzati nelle due linee cellulari.

È stata successivamente effettuata una quantificazione relativa dei trascritti dei recettori estrogenici nelle cellule HEL e MEG01 durante il differenziamento.

I dati sono stati analizzati ponendo i livelli di espressione nelle HEL e nelle MEG01 non differenziate uguali a 100 ed esprimendo i relativi valori nelle cellule differenziate come percentuale.

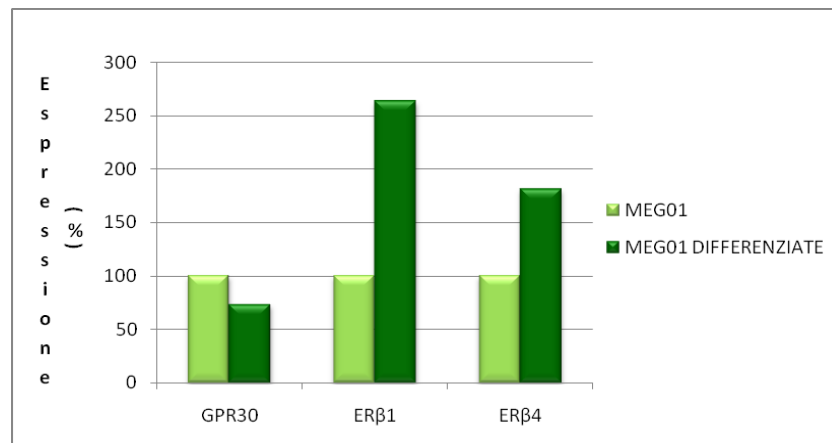
I risultati ottenuti indicano che nelle HEL differenziate l'espressione del GPR30 non è rilevabile, mentre si osserva una diminuzione di ER $\beta$ 1 del 91,1% e di ER $\beta$ 4 del 90,2% rispetto all'espressione nelle cellule non differenziate (Figura 5)



**Figura 5:** Real-time PCR

*Espressione di GPR30, ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4 nelle HEL differenziate rispetto alle HEL non differenziate. L'espressione di ER $\beta$ 1 risulta essere l'8,9% nelle HEL differenziate, mentre quella di ER $\beta$ 4 è il 9,8% rispetto alle HEL non differenziate, scelte come calibratore.*

Per quanto riguarda invece le MEG01 differenziate, si osserva una diminuzione dei livelli di espressione del GPR30 del 26,8% ed un incremento dell'espressione di ER $\beta$ 1 del 163,% e di ER $\beta$ 4 del 81,1% rispetto all'espressione nelle cellule non differenziate (Figura 6).



**Figura 6:** Real-time PCR

*Espressione di GPR30, ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4 nelle MEG01 differenziate rispetto alle MEG01 non differenziate. L'espressione del GPR30 risulta essere il 73,2%, di ER $\beta$ 1 il 263,3% mentre quella di ER $\beta$ 4 è il 181,1% nelle MEG01 differenziate rispetto alle MEG01 non differenziate, scelte come calibratore.*

## 4.2 I RECETTORI PER GLI ESTROGENI NEL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOCITARIO

Parallelamente siamo andati ad indagare la variazione dell'espressione dei recettori degli estrogeni nel differenziamento megacariocitario.

Le cellule staminali CD34 positive sono state estratte dal sangue di cordone ombelicale di donatori sani e le sacche sono state processate entro 72 ore dalla nascita.

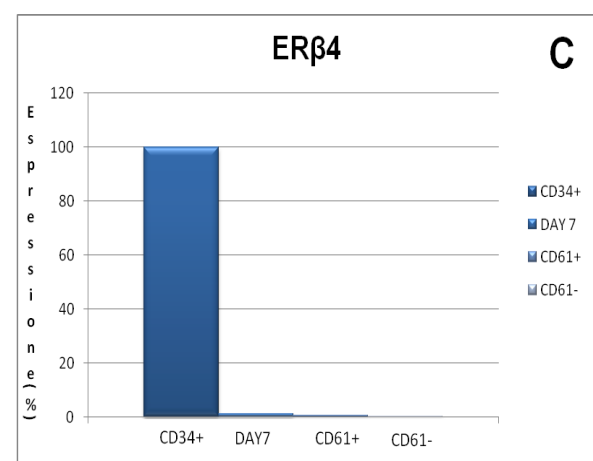
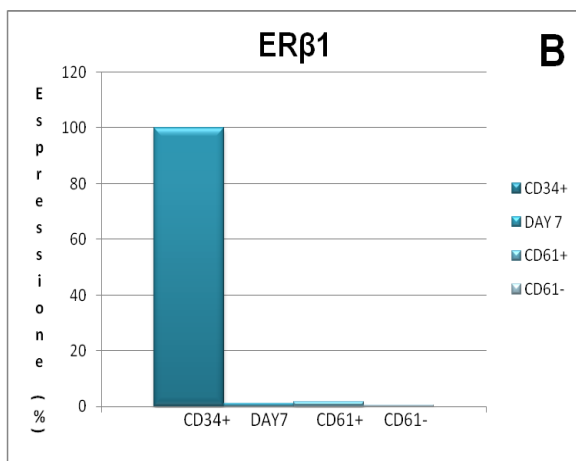
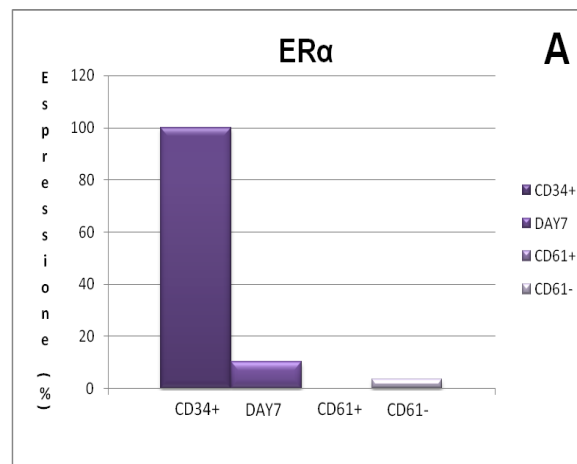
Inizialmente abbiamo pensato di valutare la presenza delle proteine di interesse tramite SDS-Page e Western blot. Tuttavia oltre al problema dell'aspecificità degli anticorpi utilizzati sono stati riscontrati due problemi aggiuntivi. Le cellule erano state isolate con un metodo immunomagnetico e tali anticorpi potevano mascherare la banda della proteina di interesse o bloccare la sua migrazione. Una possibile soluzione era l'utilizzo di condizioni non riducenti per dissociare i campioni; tuttavia alcuni anticorpi non riconoscono le proteine in tali condizioni che per di più possono migrare ad un'altezza diversa rispetto a ciò che avviene in presenza di  $\beta$ -mercaptoetanololo.

Inoltre il numero di cellule era talmente esiguo ed la concentrazione proteica bassa che era richiesta una quantità di staminali e quindi di sangue troppo elevata.

Sono quindi passata a valutare l'espressione genica di ER $\alpha$  alcune isoforme di ER $\beta$  e di GPR30 durante il differenziamento megacariocitario.

In ogni esperimento le cellule staminali derivanti dal sangue tre cordoni sono state riunite per avere un numero sufficiente di cellule e per eliminare la variabilità biologica. Le cellule sono state poste in coltura ad una concentrazione di  $1 \times 10^6$  cells/ml in terreno StemSpan in presenza di 10 ng/ml di TPO, IL6 e IL11. L'RNA totale è stato estratto dalle cellule staminali CD34+, al settimo giorno ed al tredicesimo giorno di differenziamento, separando le cellule CD61 positive dalle CD61 negative, in quanto il CD61 rappresenta la subunità  $\beta$  della GPIIb/IIIa, altamente espressa nei megacariociti differenziati. Essendo i megacariociti poliploidi, estratto l'RNA abbiamo valutato la presenza di contaminazione genomica ed i campioni positivi sono stati trattati con DNAsil. Il cDNA ottenuto da retrotrascrizione è stato usato per amplificare mediante real-time PCR i trascritti di ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 4 e GPR30. Anche in questo caso abbiamo effettuato una quantificazione relativa usando la GAPDH come controllo endogeno. Le cellule CD34 positive sono state usate come calibratore ed il valore di espressione dei recettori in esame in tali cellule è stato posto uguale a 100. L'espressione di ER $\alpha$  diminuisce del 90% rispetto alle CD34+ al settimo giorno del

differenziamento che diventa non rilevabile nei megacariociti CD61 positivi differenziati. I trascritti di ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4 mostrano livelli di espressione simili nelle diverse fasi del differenziamento analizzate. Infatti al settimo giorno l'espressione di ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4 è dell'1,1%, mentre al tredicesimo giorno è rispettivamente dell' 1,6% e dello 0,6% (Figura 7).



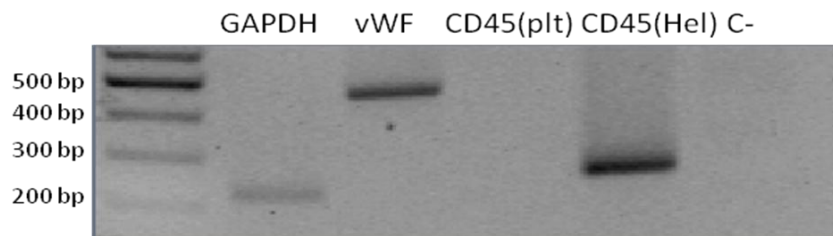
**Figura 7: Real-time PCR**

*Espressione di ER $\alpha$  (A), ER $\beta$ 1 (B) e ER $\beta$ 4 (C) durante il differenziamento megacariocitario.*

Il GPR30 risulta essere espresso nelle cellule CD34+ mentre non sembra essere rilevabile nelle cellule differenziate (dati non mostrati).

### 4.3 I RECETTORI PER GLI ESTROGENI NELLE PIASTRINE

Le piastrine sono state isolate da sangue periferico di donatori sani. Per purificarle dai leucociti contaminanti il plasma è stato dispensato su un gradiente discontinuo di Optiprep (Progen). Per verificare la purezza delle piastrine isolate, è stato estratto l'RNA totale ed è stata effettuata un'RT-PCR per amplificare il trascritto del CD45, principale marcatore leucocitario. Abbiamo inoltre verificato che l'RNA estratto fosse di derivazione piastrinica amplificando il trascritto per il vWF (Figura 8).



**Figura 8:** RT-PCR

*Sono stati amplificati: GAPDH (217 bp), VWF (451 bp) e CD45 (245 bp) a partire da cDNA di piastrine purificate. Il trascritto CD45 è stato inoltre amplificato da cDNA di cellule HEL come controllo positivo.*

Il cDNA piastrinico è stato utilizzato in real-time PCR per amplificare i trascritti di ER $\alpha$ , GPR30, ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4. Anche in questo caso il cDNA delle cellule CD34 positive è stato utilizzato come calibratore nella quantificazione relativa. I dati ottenuti indicano che ER $\alpha$  e GPR30 sembrano non essere espressi nelle piastrine mentre per ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4 è rilevabile un aumento della fluorescenza dopo il trentacinquesimo ciclo di amplificazione. Un aumento di fluorescenza così tardivo può indicare che la concentrazione del cDNA di partenza è molto scarsa o che è stato amplificato cDNA aspecifico. In ogni caso i risultati ottenuti non ci permettono di quantificare l'espressione di ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4.



## 5. DISCUSSIONE

Gli estrogeni sono ormoni steroidei in grado di regolare processi biologici come la proliferazione cellulare, la morfogenesi, il differenziamento cellulare, l'apoptosi e l'omeostasi.

Essi sono in grado di diffondere attraverso la membrana e, una volta legati a specifici recettori nucleari, controllano la trascrizione di geni target (Koide et al, 2007). Tali recettori, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , hanno un'elevata omologia strutturale in quanto entrambi sono costituiti da un dominio di legame al ligando, un dominio di legame a sequenze target localizzate sul DNA e due domini di transattivazione genica; si distinguono tuttavia per diversa affinità di legame al ligando, diversa localizzazione tissutale e diversa attivazione genica (Cheskis et al, 2007).

È stato osservato che gli estrogeni sono anche in grado di mediare risposte cellulari rapide non genomiche tramite recettori associati alle membrane che sono: i classici ER $\alpha$  e ER $\beta$  ed un recettore a sette domini transmembrana associato a proteine G, il GPR30 (Filardo et al., 2002).

Sempre maggiori evidenze supportano l'ipotesi secondo cui gli estrogeni possano rivestire un ruolo importante nei processi di differenziamento megacariocitario. Infatti recenti studi hanno dimostrato che i megacariociti, come anche le piastrine, esprimono i recettori classici per gli estrogeni (Khetawat et al, 2000) e che la loro espressione è modulata durante la megacariopoiesi sotto stimolazione estrogenica (Bord et al, 2004).

Nessuno studio tuttavia ha ancora valutato quale sia il ruolo della segnalazione non genomica estrogenica nel differenziamento megacariocitario. In particolare non è ancora nota la funzione del GPR30 e delle diverse isoforme di ER $\beta$  nei megacariociti.

A tale scopo, in questo studio pilota, siamo andati a indagare l'espressione di ER $\alpha$ , alcune isoforme di ER $\beta$  e del GPR30 nel differenziamento di HEL e MEG01, linee cellulari megacarioblastiche, e nel differenziamento megacariocitario a partire da cellule staminali estratte da sangue di cordone ombelicale.

I dati ottenuti mediante real-time PCR in HEL e MEG01 dimostrano che le due linee cellulari hanno una diversa espressione dei recettori in esame. Infatti mentre nelle HEL l'espressione di ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4 sembra diminuire notevolmente, nelle cellule MEG01 l'espressione di tali isoforme sembra aumentare durante il differenziamento. Inoltre nelle HEL differenziate l'espressione del GPR30

non è rilevabile, invece nelle cellule MEG01 appare leggermente diminuita. In entrambe le linee cellulari il trascritto ER $\alpha$  risulta non essere espresso.

Lo studio è stato proseguito valutando la variazione di espressione dei recettori analizzati su cellule staminali CD34+ il cui differenziamento in senso megacariocitario è stato indotto usando trombopoietina, interleuchina 6 ed interleuchina 11 ed è stato seguito per un massimo di 13 giorni. Il settimo giorno è stato considerato come tappa intermedia del differenziamento. L'analisi sull'espressione di ER $\alpha$  sembra confermare i dati già presenti in letteratura che dimostrano che in condizioni basali il trascritto per ER $\alpha$  diminuisce nel corso del differenziamento (Bord et al, 2004), fino a non essere rilevabile nelle cellule CD61+.

I dati di real-time PCR ottenuti su ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4 mostrano che l'espressione di entrambe le isoforme diminuisce notevolmente già nel passaggio da cellula staminale al primo stadio del differenziamento analizzato e si mantiene pressoché costante al tredicesimo giorno. Lo studio dell'espressione del GPR30 ha dimostrato che il suo trascritto è presente nelle cellule staminali, ma non è più rilevabile nei diversi stadi analizzati.

Per quanto riguarda le piastrine i maggiori problemi nell'analisi del loro trascrittoma sono dovuti alla scarsa quantità di RNA messaggero ed alla contaminazione leucocitaria, in quanto i leucociti posseggono un contenuto di RNA molto maggiore rispetto alle piastrine, perciò una minima contaminazione può compromettere la veridicità dell'analisi. L'RNA estratto dalle diverse preparazioni piastriniche è stato unito per aumentarne la concentrazione e diminuire la variazione interindividuale. Tuttavia non è stato possibile quantificare l'espressione di ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4 in quanto lo strumento rilevava un aumento significativo della fluorescenza solo dopo il trentacinquesimo ciclo. Un aumento di fluorescenza così tardivo può indicare che la concentrazione del cDNA di partenza è molto scarsa o che è stato amplificato cDNA aspecifico. Inoltre nelle piastrine ER $\alpha$  e il GPR30 sembrano non essere espressi.

Riassumendo, i dati ottenuti suggeriscono che il profilo di espressione dei recettori degli estrogeni nel differenziamento delle HEL sia più simile a quello del differenziamento megacariocitario rispetto alle MEG01. I risultati di real-time PCR suggeriscono inoltre che ER $\alpha$  potrebbe rivestire un ruolo importante negli stadi precoci del differenziamento megacariocitario, ma non nel megacariocita maturo e nelle piastrine. In aggiunta l'espressione di ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4 appare fortemente modulata durante la megacariopoiesi e si mantiene pressoché costante nei diversi stadi analizzati. Per quanto riguarda il GPR30, il suo trascritto non è rilevabile già al settimo giorno del

differenziamento, dato che suggerisce la sua scarsa o nulla importanza di tale recettore nei megacariociti. Tuttavia è possibile che il GPR30 possa intervenire solo negli stadi precoci del differenziamento. Studi futuri saranno quindi volti ad indagare l'espressione del GPR30, ma anche di ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4, negli stadi precoci del differenziamento. Inoltre l'indagine sarà ampliata anche ad altre isoforme di ER $\beta$  non ancora analizzate. Dopo aver confermato i dati ottenuti fino ad oggi, sarà possibile valutare la variazione dell'espressione dei recettori in esame sotto stimolazione estrogenica.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, 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*. Nat Med. 2004; 10(1):64-71.

Avraham H, Banu N, Scadden DT, Abraham J, Groopman JE. *Modulation of megakaryocytopoiesis by human basic fibroblast growth factor*. Blood. 1994; 83(8):2126-32.

Berlanga O, Bobe R, Becker M, Murphy G, Leduc M, Bon C, Barry FA, Gibbins JM, Garcia P, Frampton J, Watson SP. *Expression of the collagen receptor glycoprotein VI during megakaryocyte differentiation*. Blood. 2000; 96(8):2740-5.

Birschmann I, Mietner S, Dittrich M, Pfrang J, Dandekar T, Walter U. *Use of functional highly purified human platelets for the identification of new proteins of the IPP signaling pathway*. Thromb Res. 2008;122(1):59-68.

Bord S, Frith E, Ireland DC, Scott MA, Craig JI, Compston JE. *Estrogen stimulates differentiation of megakaryocytes and modulates their expression of estrogen receptors alpha and beta*. J Cell Biochem. 2004; 92(2):249-57.

Bord S, VEDI S, Beavan SR, Horner A, Compston JE. *Megakaryocyte population in human bone marrow increases with estrogen treatment: a role in bone remodeling?* Bone. 2000; 27(3):397-401.

Brown SB, Clarke MC, Magowan L, Sanderson H, Savill J. *Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase-independent cell clearance program*. J Biol Chem. 2000; 275(8):5987-96.

Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S, Freedman LP. *Signaling by estrogens*. J Cell Physiol. 2007; 213(3):610-7.

- Choi ES, Hokom M, Bartley T, Li YS, Ohashi H, Kato T, Nichol JL, Skrine J, Knudten A, Chen J. *Recombinant human megakaryocyte growth and development factor (rHuMGDF), a ligand for c-Mpl, produces functional human platelets in vitro.* Stem Cells. 1995a; 13(3):317-22.
- Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. *Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional.* Blood. 1995b; 85(2):402-13.
- Clarke MC, Savill J, Jones DB, Noble BS, Brown SB. *Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death.* J Cell Biol. 2003; 160(4):577-87.
- 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.
- den Dekker E, van Abel M, van der Vuurst H, van Eys GJ, Akkerman JW, Heemskerk JW. *Cell-to-cell variability in the differentiation program of human megakaryocytes.* Biochim Biophys Acta. 2003; 1643(1-3):85-94.
- Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS. *Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets.* Cell. 2005 Aug 12;122(3):379-91.
- Falcieri E, Bassini A, Pi. U erpaoli S, Luchetti F, Zamai L, Vitale M, Guidotti L, Zauli G. *Ultrastructural characterization of maturation, platelet release, and senescence of human cultured megakaryocytes.* Anat Rec. 2000; 258(1):90-9.
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. *Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF.* Mol Endocrinol. 2000; 14(10):1649-60.

Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI. *Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis.* Mol Endocrinol. 2002; 16(1):70-84.

Filardo EJ, Thomas P. *GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release.* Trends Endocrinol Metab. 2005; 16(8):362-7.

Golde DW. *The stem cell.* Sci Am. 1991; 265(6):86-93.

Gordge MP. *Megakaryocyte apoptosis: sorting out the signals.* Br J Pharmacol. 2005; 145(3):271-3.

Guerriero A, Worford L, Holland HK, Guo GR, Sheehan K, Waller EK. *Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells.* Blood. 1997; 90(9):3444-55.

Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. *Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice.* Science. 1994; 265(5177):1445-7.

Hartwig J, Italiano J Jr. *The birth of the platelet* J Thromb Haemost. 2003; 1(7):1580-6.

Hall JM, Couse JF, Korach KS. *The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling.* J Biol Chem. 2001; 276(40):36869-72.

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(6):1299-312.

Italiano JE Jr, Patel-Hett S, Hartwig JH. *Mechanics of proplatelet elaboration.* J Thromb Haemost. 2007;5 Suppl 1:18-23.

Italiano JE Jr, Shivdasani RA. *Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets.* J Thromb Haemost. 2003; 1(6):1174-82.

Jelkmann W. *The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin.* Eur J Gastroenterol Hepatol. 2001;13(7):791-801.

Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE Jr, Shivdasani RA, von Andrian UH. *Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow*. Science. 2007; 317(5845):1767-70.

Kaluzhny Y, Ravid K. *Role of apoptotic processes in platelet biogenesis*. Acta Haematol. 2004; 111(1-2):67-77.

Kaushansky K. *The molecular mechanisms that control thrombopoiesis*. J Clin Invest. 2005a; 115(12):3339-47.

Kaushansky K. *Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell*. Ann N Y Acad Sci. 2005b; 1044:139-41.

Kelemen E. *Thrombopoietin*. Br Med J. 1970; 2(5711):733-4.

Kerrigan SW, Gaur M, Murphy RP, Shattil SJ, Leavitt AD. *Caspase-12: a developmental link between G-protein-coupled receptors and integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation*. Blood. 2004; 104(5):1327-34.

Khetawat G, Faraday N, Nealen ML, Vijayan KV, Bolton E, Noga SJ, Bray PF. *Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression*. Blood. 2000; 95(7):2289-96.

Kim JA, Jung YJ, Seoh JY, Woo SY, Seo JS, Kim HL. *Gene expression profile of megakaryocytes from human cord blood CD34(+) cells ex vivo expanded by thrombopoietin*. Stem Cells. 2002; 20(5):402-16.

Koide A, Zhao C, Naganuma M, Abrams J, Deighton-Collins S, Skafar DF, Koide S. *Identification of regions within the F domain of the human estrogen receptor alpha that are important for modulating transactivation and protein-protein interactions*. Mol Endocrinol. 2007; 21(4):829-42.

Kuter DJ, Gminski DM, Rosenberg RD. *Transforming growth factor beta inhibits megakaryocyte growth and endomitosis*. Blood. 1992; 79(3):619-26.

Leung YK, Mak P, Hassan S, Ho SM. *Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug;103(35):13162-7.

- Levin ER. *Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors*. J Appl Physiol. 2001; 91(4):1860-7.
- Long MW, 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(3):569-75.
- Lu ML, Schneider MC, Zheng Y, Zhang X, Richie JP. *Caveolin-1 interacts with androgen receptor. A positive modulator of androgen receptor mediated transactivation*. J Biol Chem. 2001; 276(16):13442-51.
- Majka M, Baj-Krzyworzeka M, Kijowski J, Reca R, Ratajczak J, Ratajczak MZ. *In vitro expansion of human megakaryocytes as a tool for studying megakaryocytic development and function*. Platelets. 2001; 12(6):325-32.
- Manavathi B, Kumar R. *Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: two sides of the coin*. J Cell Physiol. 2006; 207(3):594-604.
- McKenna NJ, O'Malley BW. *Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators*. Cell. 2002; 108(4):465-74.
- McNiece IK, Briddell RA. *Stem cell factor*. J Leukoc Biol. 1995; 58(1):14-22.
- Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM. *Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms*. Biochem Biophys Res Commun. 1998; 247(1):75-8.
- Moro L, Reineri S, Piranda D, Pietrapiana D, Lova P, Bertoni A, Graziani A, Defilippi P, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F. *Nongenomic effects of 17beta-estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor beta and Src kinase*. Blood. 2005; 105(1):115-21.
- Nagata Y, Yoshikawa J, Hashimoto A, Yamamoto M, Payne AH, Todokoro K. *Proplatelet formation of megakaryocytes is triggered by autocrine-synthesized estradiol*. Genes Dev. 2003 Dec 1;17(23):2864-9.



- Nurden P, Poujol C, Nurden AT. *The evolution of megakaryocytes to platelets*. Baillieres Clin Haematol. 1997; 10(1):1-27.
- Nutt SL, Metcalf D, D'Amico A, Polli M, Wu L. *Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors*. J Exp Med. 2005; 201(2):221-31.
- Odell TT Jr, Jackson CW, Friday TJ. *Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy*. Blood. 1970; 35(6):775-82.
- Ogawa D. *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. Blood. 1993; 81(11):2844-53.
- Pappas TC, Gametchu B, Watson CS. *Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding*. FASEB J. 1995; 9(5):404-10.
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN. *Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors*. Cell. 1998; 93(3):385-95
- Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. J Clin Invest. 2005; 115(12):3348-54.
- Perry MJ, Samuels A, Bird D, Tobias JH. *Effects of high-dose estrogen on murine hematopoietic bone marrow precede those on osteogenesis*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000; 279(5):E1159-65.
- Poujol C, Ware J, Nieswandt B, Nurden AT, Nurden P. *Absence of GPIbalpha is responsible for aberrant membrane development during megakaryocyte maturation: ultrastructural study using a transgenic model*. Exp Hematol. 2002; 30(4):352-60.
- Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. *Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells*. Mol Endocrinol. 1999; 13(2):307-19.

- Reineri S, Bertoni A, Sanna E, Baldassarri S, Sarasso C, Zanfa M, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F. *Membrane lipid rafts coordinate estrogen-dependent signaling in human platelets*. Biochim Biophys Acta. 2007; 1773(2):273-8.
- Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE Jr. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. Blood. 2005; 106(13):4066-75.
- Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR. *Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(11):5930-5.
- Sanz C, Benet I, Richard C, Badia B, Andreu EJ, Prosper F, Fernández-Luna JL. *Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes*. Exp Hematol. 2001; 29(6):728-35.
- Schmitt A, Guichard J, Massé JM, Debili N, Cramer EM. *Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets*. Exp Hematol. 2001; 29(11):1295-302.
- Shaklai M, Tavassoli M. *Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process*. J Ultrastruct Res. 1978; 62(3):270-85.
- Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ. *Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation*. Mol Endocrinol. 2002; 16(1):116-27.
- Tarantino MD, Kunicki TJ, Nugent DJ. *The estrogen receptor is present in human megakaryocytes*. Ann N Y Acad Sci. 1994; 714:293-6.
- Tavassoli M, Aoki M. *Localization of megakaryocytes in the bone marrow*. Blood Cells. 1989; 15(1):3-14.

Tomer A. *Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes.* Blood. 2004; 104(9):2722-7.

Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, Crossley M, Orkin SH. *FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation.* Cell. 1997; 90(1):109-19.

Williams N. *Megakaryocyte growth factors.* Immunol Ser. 1990; 49:215-29.

Youssefian T, Cramer EM. *Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies.* Blood. 2000; 95(12):4004-7.

Zucker-Franklin D, Kaushansky K. *Effect of thrombopoietin on the development of megakaryocytes and platelets: an ultrastructural analysis.* Blood. 1996; 88(5):1632-8.

## 7. ATTIVITÀ FORMATIVA

### Seminari:

20 dicembre 2007

"Human papillomavirus loads and its correlation with non-melanoma skin cancer" – Dott. Soenke Weissenborg

14 gennaio 2008

" Biologia molecolare e genetica in ambito forense: principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche" - Tenente Dott. Giorgio Portera

21 gennaio 2008

"K<sup>+</sup> channels in the heart: in and out of control" – Dott. Susanne Radicke

23 gennaio 2008

"Integrin trafficking and tumour cell invasiveness" – Dott. Jim Norman

24 gennaio 2008

"La Microscopia a Forza Atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni" – Prof. Mario Raspanti

6 febbraio 2008

"Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo" – Dott. Gianluca DeBellis

7 febbraio 2008

"La proteina HMGB1 é un segnale di danno tissutale" – Prof. M. E. Bianchi

21 febbraio 2008

"New treatment strategies for multiple myeloma" – Prof. A. Palumbo

28 febbraio 2008

"Caratterizzazione molecolare della leucemia linfatica cronica" - Prof. Valter Gattei

5 marzo 2008

"Analytic vaccinology and human cytomegalovirus: human monoclonal antibodies as tools to identify novel antigens for protective vaccination" – Dott. Annalisa Macagno

6 marzo 2008

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

7 marzo 2008

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

13 marzo 2008

"Il sistema Ghrelin: aspetti endocrini e metabolici" – Prof. F. Broglio e C. Gauna

20 marzo 2008

"Immunologia della psoriasi" - Prof. Giampiero Girolomoni

3 aprile 2008

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

9 aprile 2008

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

14 aprile 2008

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

16 aprile 2008

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

17 aprile 2008

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

24 aprile 2008

“Ghrelin e pancreas endocrino” Prof. Riccarda Granata

15 maggio 2008

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

22 maggio 2008

“La ricerca farmacologica: dal laboratorio alla clinica” - Dott. Domenico Valle

23 maggio 2008

“Sistema degli Endocannabinoidi: nuovo target terapeutico per l'obesità e le sue complicanze cardio-metaboliche” - Prof. Uberto Pagotto

26 maggio 2008

“Copy number variations: non solo ritardo mentale” - Prof. Orsetta Zuffardi

5 giugno 2008

“Cap-Analysis Gene Expression (CAGE) Analysis of transcriptional complexity and regulation” - Dr. Piero Carninci

3 e 11 giugno 2008

“Il Trasferimento tecnologico dall'università all'impresa” - Fabrizio Conicella , Kevin Romani e Alberto Baldi

12 giugno 2008

“Mechanical Ventilation and Multiple Organ Failure” - Dr. Frans B. Plotz

13 giugno 2008

“Problem solving in patologia epatica” - Prof. Gavino Faà

26 giugno 2008

“Tecniche FISH nello studio dei linfomi non-Hodgkin” Dott.ssa Maria Grazia Tibiletti

30 giugno 2008

“From megakaryocytes to platelets regulation, environment and pathology” - Dott.ssa  
Alessandra Balduini

3 luglio 2008

“Recenti aspetti in tema di malattie uromodulina associate” - Prof. Scolari

1,2 e 16,18 luglio 2008

- ✓ “Recombinant protein expression”
- ✓ “Recombinant antibodies and other affinity reagents”
- ✓ “Display technologies: phage yeast bacteria and ribosoma”
- ✓ “Fluorescent proteins” - Dr. Andrew Bradbury

# ***SEZIONE 2***



## CORSI FREQUENTATI:

Corso di Inglese

Corso di Radioprotezione

## CONGRESSI FREQUENTATI

CNBX, Perugia 17-19 settembre 2008

## COMUNICAZIONI A CONGRESSI

A) *Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)*

B) *Altre comunicazioni*

CNBX, Perugia 17-19 settembre 2008

*"Inhibition of platelet aggregation by the phytoestrogen 8-prenylnaringenin"*

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

CNBX, Perugia 17-19 settembre 2008

*"Different expression of estrogen receptors gpr30 and ERβ isoforms in megakaryoblastic and erythroleukemia cell lines"*

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

53° National meeting of Italian Society of Biochemistry and Molecular biology - Riccione, 23-26 settembre 2008

*"Dehydroepiandrosterone inhibits platelet aggregation with a cGMP-dependent mechanism"*

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

9<sup>a</sup> Riunione del Gruppo di Studio Piastrine, S. Pellegrino Terme 12-14 ottobre 2008

*“Study of the mechanisms of platelet inhibition induced by the phytoestrogen 8-PN”*

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

9<sup>a</sup> Riunione del Gruppo di Studio Piastrine, S. Pellegrino Terme 12-14 ottobre 2008

*“The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> receptors”*

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