

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



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

**Relazione 2° anno**

**TITOLO**

**Maturazione e differenziamento megacariocitario:  
il ruolo degli endocannabinoidi**

Candidato: Bagarotti Alessandra

**Tutor: Professoressa Fabiola Sinigaglia**

<b>SEZIONE 1</b> .....	<b>3</b>
<b>RISULTATI SCIENTIFICI</b> .....	<b>3</b>
<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
<b>LA MEGACARIOCITOPOIESI</b> .....	<b>5</b>
<b>REGOLAZIONE DELLA MEGACARIOCITOPOIESI</b> .....	<b>7</b>
<b>PRODUZIONE E RILASCIO DELLE PIASTRINE</b> .....	<b>10</b>
<b>GLI ENDOCANNABINOIDI</b> .....	<b>12</b>
<b>GLI ENDOCANNABINOIDI: sintesi e degradazione</b> .....	<b>13</b>
<b>GLI ENDOCANNABINOIDI: i recettori</b> .....	<b>15</b>
<b>SCOPO DEL LAVORO</b> .....	<b>18</b>
<b>METODI</b> .....	<b>20</b>
Isolamento di cellule staminali ematopoietiche murine.....	20
Preparazione di piastrine murine.....	20
Preparazione di lisati cellulari totali e analisi proteica.....	21
Analisi dell'espressione genica di CB1 e CB2 mediante real time -PCR .....	21
<b>ENDOCANNABINOIDI E DIFFERENZIAMENTO CELLULARE</b> .....	<b>22</b>
<b>RISULTATI</b> .....	<b>23</b>
Analisi del differenziamento megacariocitario.....	23
Espressione di CB1 e CB2: analisi mediante Immunoblotting .....	25
Real Time -PCR .....	27
Endocannabinoidi e differenziamento cellulare.....	29
<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>34</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>38</b>
<b>SEZIONE 2</b> .....	<b>49</b>

# **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.

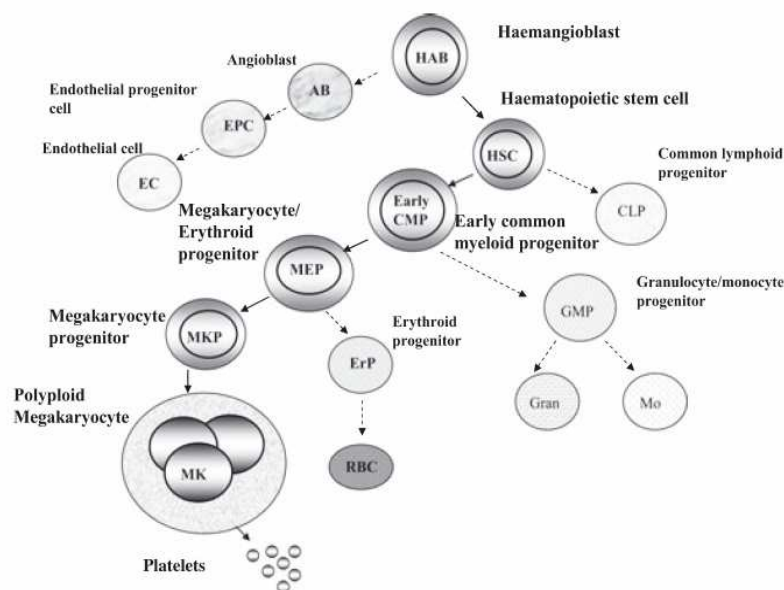
# INTRODUZIONE

## 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). 5

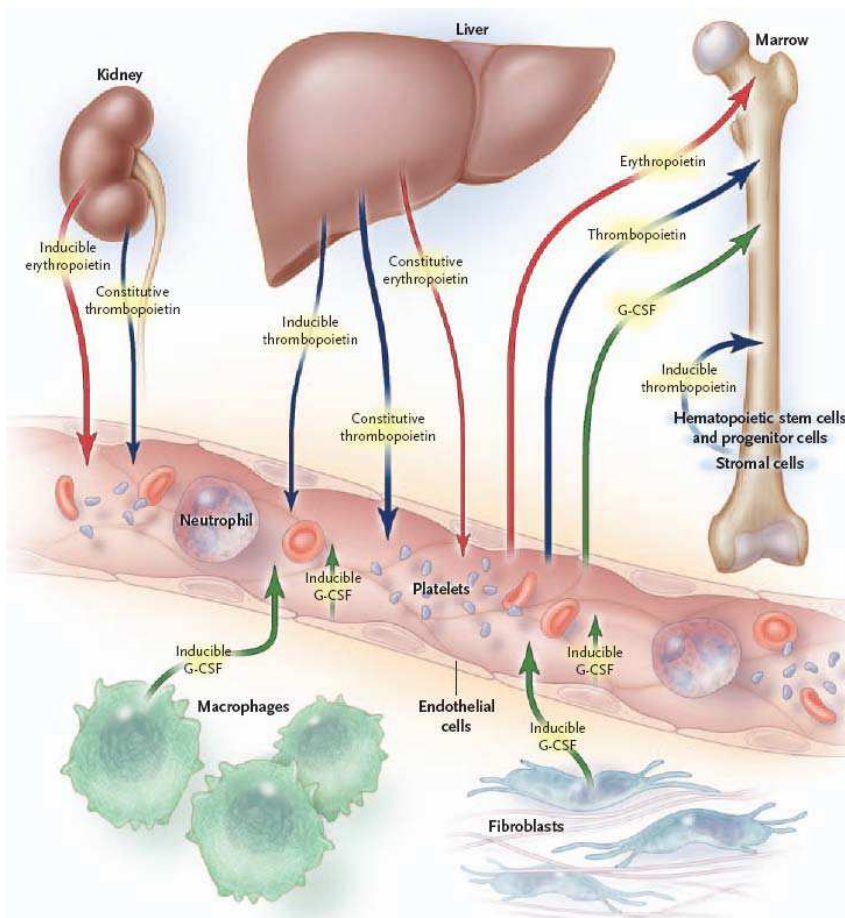
I megacariociti, per poter sintetizzare le piastrine, devono modificare il loro citoplasma: prima che il megacariocita possa rilasciare i trombociti, deve ingrossarsi considerabilmente fino a raggiungere un diametro approssimativo di 100  $\mu\text{m}$ ; contemporaneamente deve aumentare anche il numero 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 ( $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 $\alpha$ ). 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.

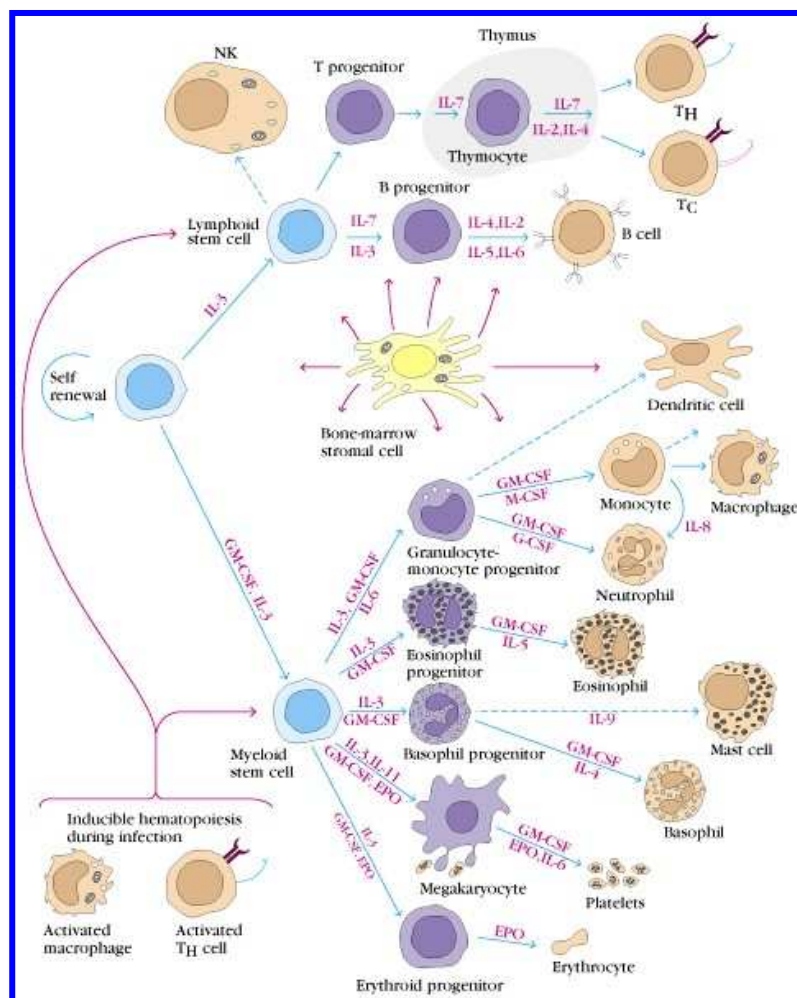
La TPO (trombopoietina), anche conosciuta come ligando di c-Mpl, oltre a giocare un ruolo centrale nella sopravvivenza e proliferazione delle cellule staminali emopoietiche (Kaushansky. 2005b, 2006), è il principale regolatore della trombopoiesi. Nell'uomo viene prodotta costitutivamente dal fegato ed 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- $\beta$ 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).

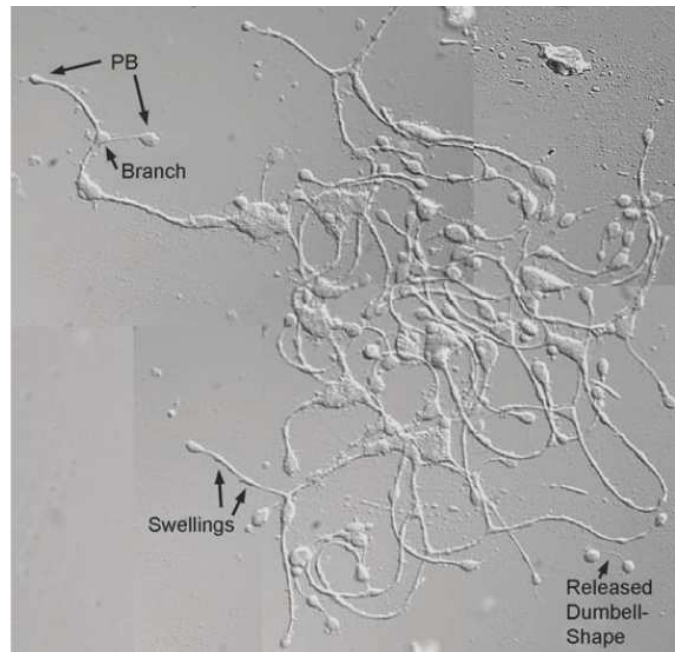
## PRODUZIONE E RILASCIO DELLE PIASTRINE

L'assemblaggio ed il rilascio delle piastrine sono ad oggi considerati eventi accoppiati, che seguono la formazione delle propiastri (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  $\mu\text{m}$  di lunghezza; 2-4  $\mu\text{m}$  di diametro), chiamate propiastri (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 propiastri: 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 propiastri 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*).



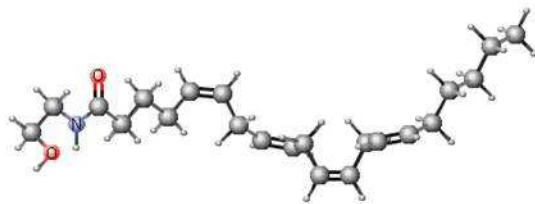
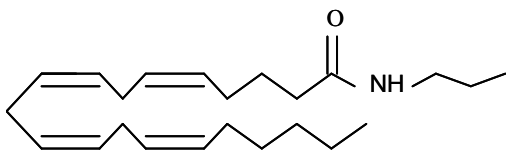
**FIG. 4 FORMAZIONE DI PROPIASTRINE:** nell'arco di poche ore, il citoplasma del megacariocita viene convertito in protrusioni filamentari chiamate propiastrine. Dall'immagine è possibile osservare lungo le estroflessioni la presenza di rigonfiamenti (che conferiscono alla propiastrina l'aspetto di una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

Dati riportati in letteratura, (*De Botton et al., 2002*), suggeriscono che alla sintesi dei trombociti si accompagnano 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.

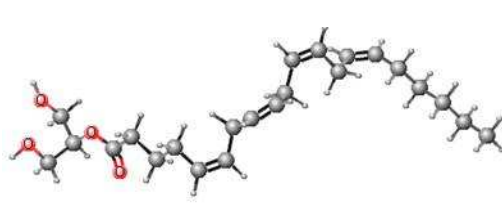
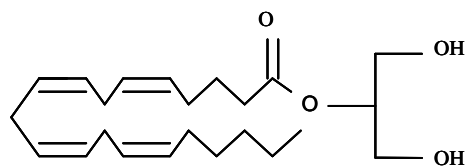
## GLI ENDOCANNABINOIDI

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*-arachidonilfosfatidiletanolamina (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-arachidonoile, 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.



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

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*).

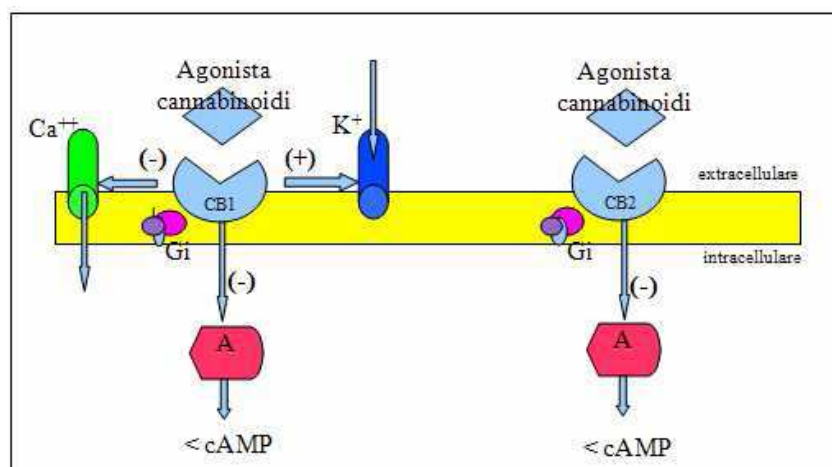


FIG. 6 Vie di trasduzione del segnale attivate dagli agonisti dei cannabinoidi

L'anandamide lega sia il CB1 che il CB2, comportandosi da agonista parziale con i recettori CB1 e mostrando una minore affinità per i CB2. Tramite modifiche strutturali sono stati derivati degli analoghi ad azione selettiva sul recettore CB1 come la metanandamide, l'arachidonil-2-cloretilamide (ACEA) e l'arachidonilciclopropilamide (ACPA) (*Pertwee et al., 2002*). Il 2-AG, che agisce invece come agonista totale dei recettori CB, condivide con l'AEA la localizzazione nelle porzioni transmembrana del sito di legame (*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 neutrofili 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 neuromediatori; 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 ematopoitiche 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 innanzitutto di valutare la presenza dei recettori cannabinici sui precursori megacariocitari e l'eventuale modulazione di espressione durante la megacariocitopoiesi, per poi chiarire l'eventuale ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento megacariocitario. 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 sia all'aumento delle dimensioni cellulari che all'espressione dell'integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ .

Durante il primo anno di dottorato la presenza dei recettori degli endocannabinoidi era stata valutata sia come trascritto tramite RT-PCR, sia come proteina, in esperimenti di Western Blotting. I dati ottenuti, tuttavia, erano da completare con ulteriori esperimenti che ho eseguito durante questo secondo anno utilizzando tecniche di Western Blotting ma anche di real time PCR; l'ultima parte degli esperimenti è dedicata allo studio degli effetti degli endocannabinoidi sul differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche verso la linea megacariocitaria.

## **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 Healthalcare) 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  $\mu$ 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 NaHCO<sub>3</sub>; 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 pastrine 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 apirasi e PGE1 1 $\mu$ 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 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 real time -PCR**

L'RNA presente nelle cellule ai diversi giorni del differenziamento, è stato estratto utilizzando il reagente Trizol (Ambion), seguendo le istruzioni indicate dalla ditta produttrice; dopo l'estrazione l'RNA è stato precipitato e successivamente risospeso in acqua RNAase free (Sigma). Dopo aver quantificato l'RNA così ottenuto (con fluorimetro Qubit – Invitrogen), il campione è stato purificato da eventuali contaminazioni genomiche e retrotrascritto in cDNA, utilizzando l'apposito kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). Per la real-time PCR la reazione è stata eseguita in un volume finale di 20 µL contenenti: sonda taqman 250 nM e primers 900 nM specifici per il trascritto (Applied Biosystem), 3 µL di cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione, Taqman gene expression master mix 1X (Applied Biosystem) e acqua sterile (quanto necessario per portare a volume). Gli esperimenti sono stati eseguiti con ABI Prism Sequence Detection System 7000 (Applied Biosystem) seguendo il seguente protocollo: 10 minuti a 95° C seguiti da 40 cicli di 95° C per 15 secondi, 50° C per 2 minuti e 60° C per 1 minuto. Come controllo endogeno abbiamo utilizzato la GAPDH (gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi) e, come calibratore, le cellule del giorno 0.

## **Endocannabinoidi e differenziamento cellulare**

Nonostante il crescente interesse, ancora pochi sono i dati disponibili riguardo al ruolo degli endocannabinoidi durante il differenziamento megacariocitico. Valk et al. hanno anche dimostrato che l'anandamide, in vitro, 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). Al fine di investigare un possibile ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento verso la linea megacariocitica, cellule staminali ematopoietiche murine sono state isolate e piastrate ad una densità iniziale di  $10^6$  cellule/mL in terreno IMDM arricchito (come precedentemente descritto). Dove necessario si è aggiunto: R-1 metanandamide  $10 \mu\text{M}$  (un analogo sintetico dell'anandamide ma più stabile); AM251 e AM630, ciascuno  $1 \mu\text{M}$ , inibitori selettivi di CB1 e CB2 rispettivamente (Cayman Chemical).

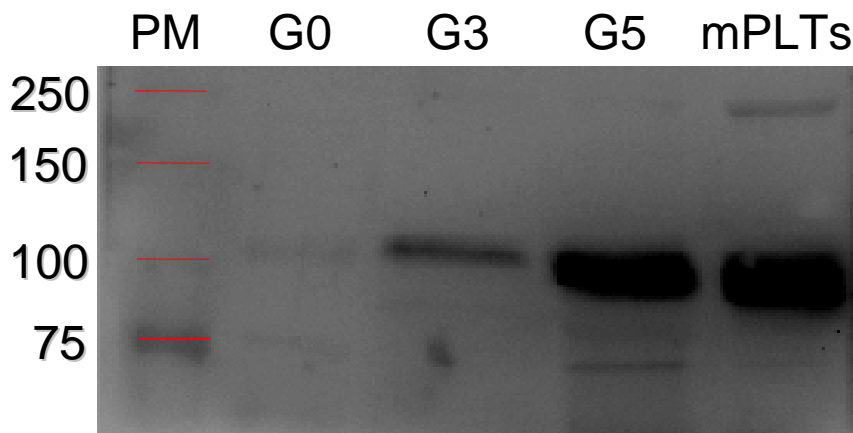
Dal momento che, come precedentemente descritto, la dimensione cellulare può in questo caso essere considerata indice di differenziamento, cellule opportunamente trattate e differenziate, sono state fotografate con fotocamera digitale collegata al microscopio (AXIOVERT 40 CFL), ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento. Con il programma ImageProPlus, cellule con diametro superiore a  $10 \mu\text{m}$  sono state quindi selezionate, contate e classificate in base alle loro dimensioni.

# RISULTATI

## Analisi del differenziamento megacariocitario

Uno degli eventi che caratterizzano la maturazione ed il differenziamento di una cellula staminale è l'acquisizione ed espressione di marker cellulo-specifici. Nel caso specifico di differenziamento megacariocitico, l'aumento di espressione dell'integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  può essere utilizzato come indicatore dell'avvenuto processo differenziativo.

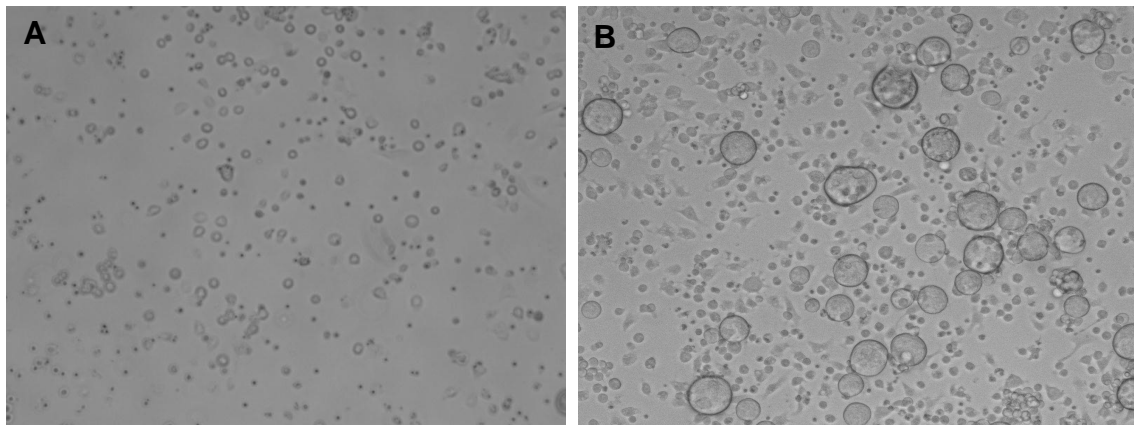
Per verificare che le cellule staminali ematopoietiche murine differenziassero correttamente, abbiamo eseguito due differenti esperimenti. Nel primo caso cellule staminali ematopoietiche murine sono state isolate come precedentemente descritto ed indotte al differenziamento; i lisati cellulari di cellule ai diversi stadi differenziativi sono stati caricati su gel di poliacrilammide (40  $\mu\text{g}$ /pozzetto) e l'immunocolorazione è stata eseguita con l'anticorpo commerciale anti-Integrin  $\beta\text{3}$  (Santa Cruz). Come atteso (figura 7) i megacariociti più differenziati esprimono progressivamente maggiori livelli di proteina (presente anche nelle piastrine isolate da sangue intero murino).



**FIG. 7 ESPRESSIONE DELL'INTEGRINA  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ :** in figura è riportata l'espressione dell'integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , nei diversi giorni di differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche e in piastrine isolate da sangue murino (mPLTs) . Com'è possibile osservare l'espressione proteica aumenta progressivamente durante il differenziamento.

Un altro evento chiave che accompagna e caratterizza la megacariocitopoiesi è, oltre all'acquisizione di marker cellulari specifici, anche l'ingrossamento del citoplasma. Per questo motivo cellule opportunamente trattate e differenziate, sono state fotografate con fotocamera digitale collegata al microscopio (AXIOVERT 40 CFL), ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento.

La figura 8 mostra un'immagine acquisita al microscopio (20X), di cellule al giorno 0 (A) e 5 (B) del differenziamento (rappresentative delle altre immagini realizzate). Com'è possibile osservare al giorno 0 le cellule sono molto piccole e con dimensioni pressoché uniformi, al giorno 5 del differenziamento invece (pannello B), alcune cellule hanno diametro considerabilmente aumentato (le possiamo quindi ritenere differenziate).

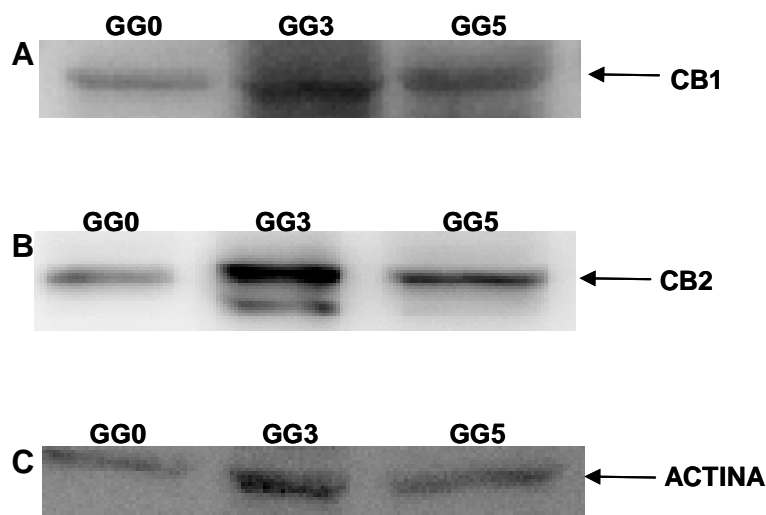


**FIG. 8 AUMENTO DI DIMENSIONI CELLULARI DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO:** le immagini (rappresentative delle altre foto realizzate) sono state acquisite con fotocamera digitale collegata al microscopio (AXIOVERT 40 CFL), ai giorni 0 (A) e 5 (B) del differenziamento. L'aumento delle dimensioni che si osserva al quinto giorno del differenziamento, è indice di avvenuto differenziamento.



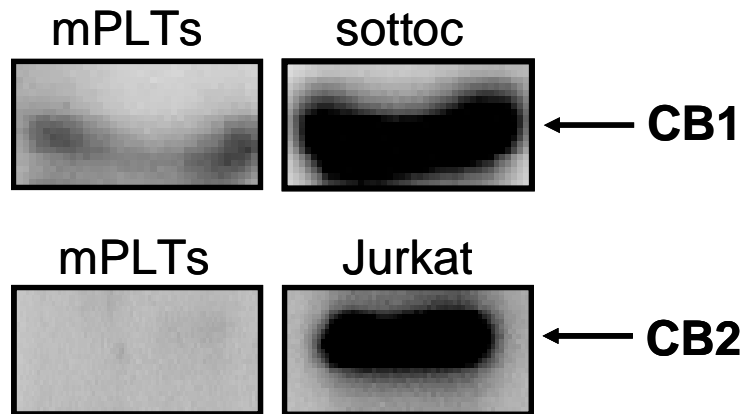
## Espressione di CB1 e CB2: analisi mediante Immunoblotting

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. I lisati proteici sono stati preparati ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento. Al quinto giorno, grazie al significativo aumento di dimensioni, i megacariociti maturi sono stati separati dal resto della popolazione cellulare mediante sedimentazione. L'immunocolorazione è stata eseguita con specifici anticorpi commerciali: anti-CB1 (Alexis) e anti-CB2 (Cayman Chemical). Com'è possibile osservare in figura 9 il CB1 (pannello A) e il CB2 (pannello B) sono presenti in tutti gli stadi del differenziamento. In particolare per il CB2, al terzo giorno del differenziamento, è possibile osservare in aggiunta alla banda principale, una banda secondaria che potrebbe essere dovuta ad una parziale degradazione della proteina o alla forma non glicosilata. Caricando le stesse quantità di lisati proteici ai diversi giorni del differenziamento e colorando la membrana con un anticorpo anti-Actina (Santa-Cruz), si ottiene l'immagine 7.c.



**FIG. 9 ESPRESSIONE DEI RECETTORI CANNABICI IN MEGACARIOCITI MURINI:** in figura sono riportate le diverse espressioni di CB1 (pannello A), CB2 (pannello B) e actina (pannello C). Sia CB1 che CB2 sono presenti in tutti gli stadi differenziativi considerati.

L'espressione dei recettori degli endocannabinoidi CB1 e CB2, è stata valutata anche in piastrine murine. Campioni di piastrine isolate da sangue murino e 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 differente: il solo CB1 sembra infatti essere presente nelle piastrine murine.

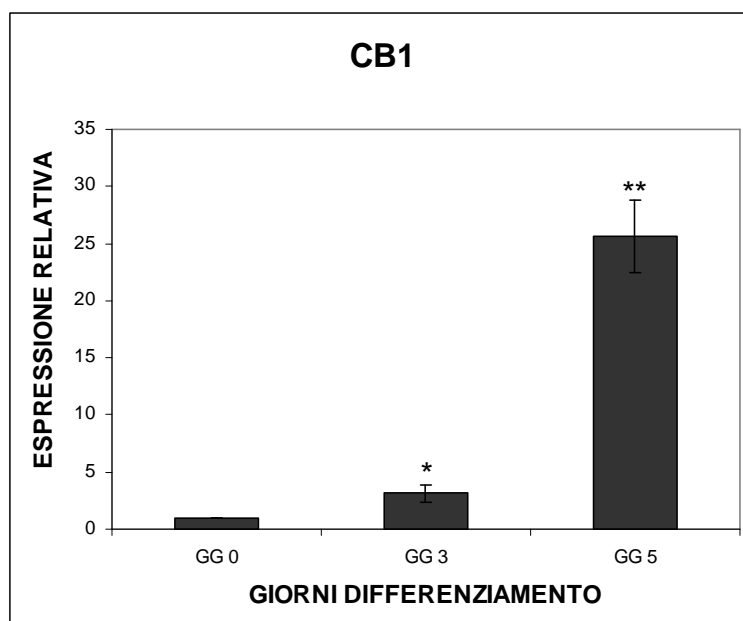


**FIG. 10 ESPRESSIONE DEI RECETTORI DEGLI ENDOCANNABINOIDI IN PIASTRINE MURINE:** in figura è riportata l'espressione di CB1 (pannello A) e CB2 (pannello B), in piastrine murine. I lisati di sottocutaneo e Jurkat sono i rispettivi controlli positivi per CB1 e CB2. Com'è possibile osservare il solo CB1 sembrerebbe essere presente nei campioni considerati.

## Real Time -PCR

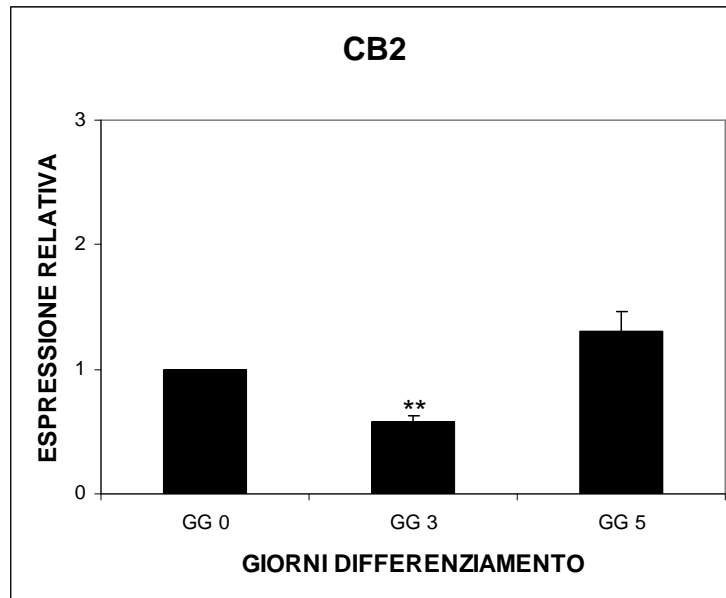
Variazioni di espressione genica di CB1 e CB2, sono stati analizzate in diverse fasi del differenziamento megacariocitico, mediante analisi di realtime-PCR semi-quantitativa. Cellule staminali ematopoietiche murine sono state raccolte da midollo osseo ed indotte al differenziamento. L'RNA estratto è stato opportunamente quantificato, retrotrascritto ed amplificato mediante real-time PCR semi-quantitativa. La presenza dei trascritti è stata analizzata al giorno 0 (raccolta cellule ed induzione al differenziamento), al giorno 3, e al giorno 5. La presenza dei trascritti è stata inizialmente valutata nelle cellule non differenziate in base ai valori dei rispettivi  $\Delta C_t$  (ciclo soglia del trascritto in analisi meno ciclo soglia del controllo endogeno GAPDH). I dati sono stati analizzati ponendo i livelli di espressione nelle cellule non differenziate uguali a 1, ed esprimendo con valori relativi i livelli di espressione nelle cellule differenziate.

Com'è possibile osservare in figura 11, l'mRNA di CB1 aumenta nel corso del differenziamento, soprattutto nell'ultima fase (dal giorno 3 al giorno 5).



**FIG. 11 ANALISI IN REAL-TIME PCR – CB1:** la presenza di trascritto del recettori cannabico CB1 è stata analizzata mediante real-time PCR semi-quantitativa. Controllo endogeno utilizzato: GAPDH (gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi). L'analisi statistica è stata condotta utilizzando test t-Student (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). Il grafico rappresenta la media di tre esperimenti indipendenti; le barre di errore mostrano l'errore standard della media.

La figura 12 mostra invece le variazioni dell'mRNA di CB2: al terzo giorno del differenziamento la quantità diminuisce in modo significativo, per poi ritornare al quinto giorno, ai livelli iniziali.

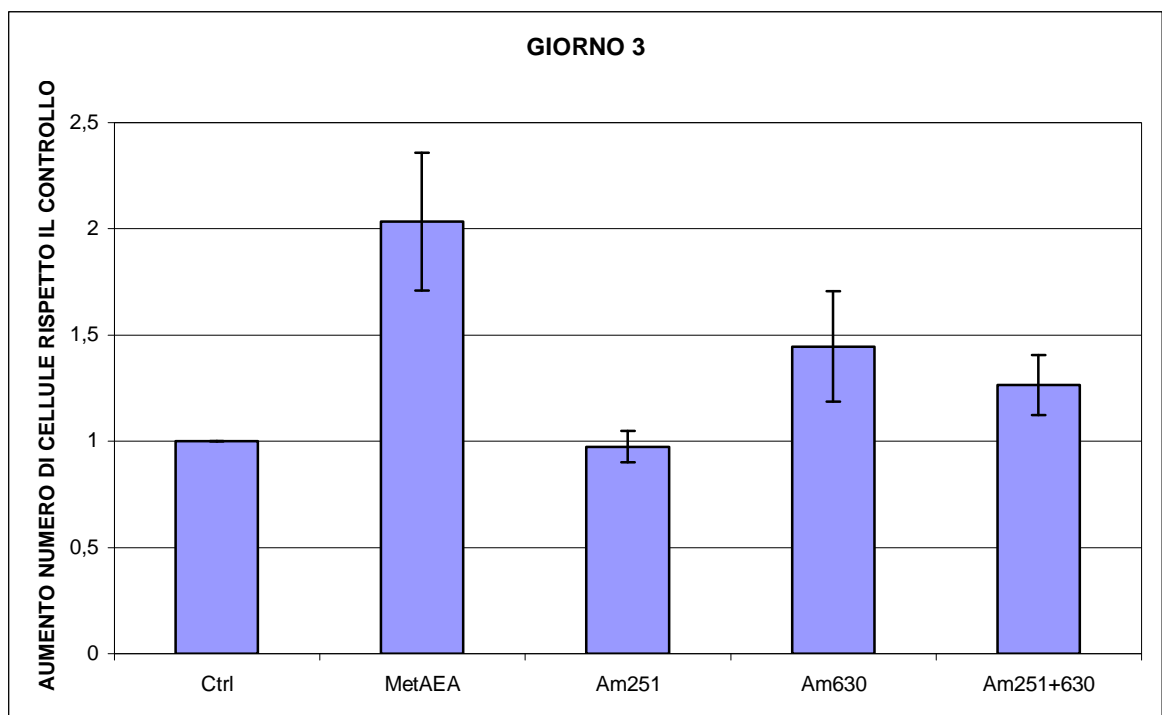


**FIG. 12 ANALISI IN REAL-TIME PCR – CB2:** quantità di RNA messaggero per CB2 presente ai vari giorni del differenziamento. Controllo endogeno utilizzato: GAPDH (gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi); analisi statistica eseguita con test t-Student ( n=3; \*\* p < 0,01). Il grafico rappresenta la media di tre esperimenti indipendenti; le barre di errore mostrano l'errore standard della media.

## **Endocannabinoidi e differenziamento cellulare**

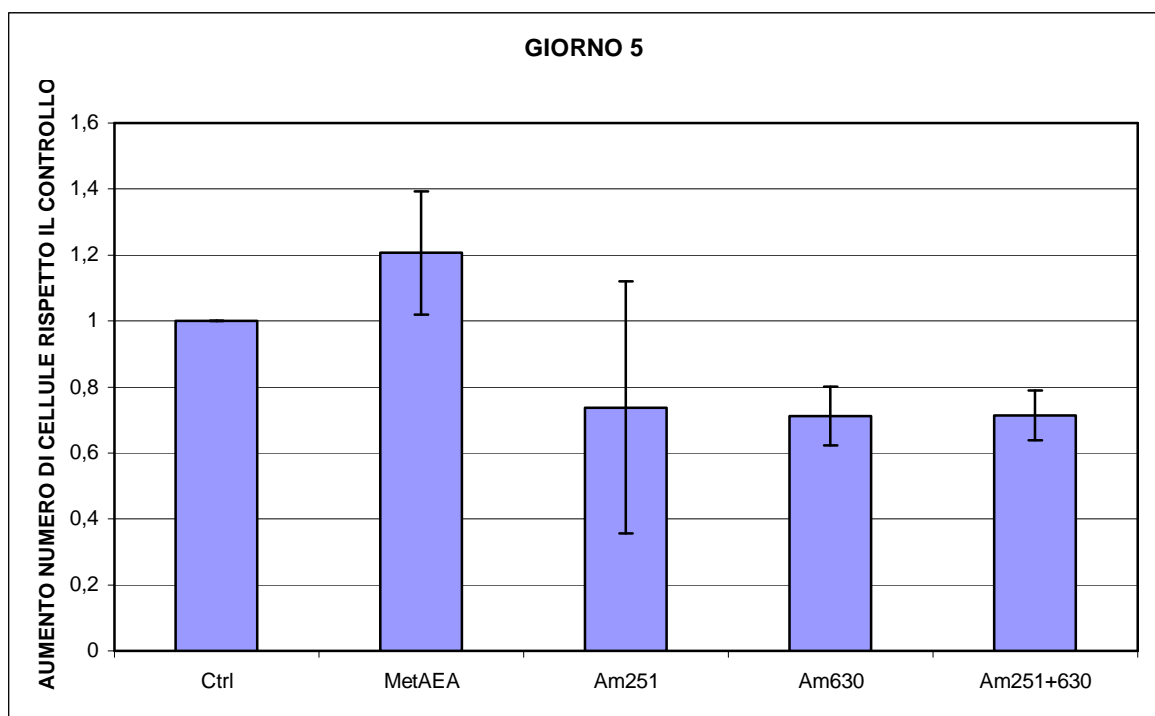
In questa sezione descriverò i preliminari esperimenti che ho condotto per valutare un possibile ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche murine verso la linea megacariocitaria. Come già spiegato, la dimensione cellulare può in questo caso essere considerata indice di differenziamento; per questo motivo cellule opportunamente trattate e differenziate, sono state fotografate con fotocamera digitale collegata al microscopio (AXIOVERT 40 CFL), ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento. Con il programma ImageProPlus, cellule con raggio superiore a 10  $\mu\text{m}$  (cellule "grandi"), sono state quindi selezionate, contate e classificate. I dati ottenuti dai primi esperimenti, che consideriamo comunque preliminari e che devono essere riconfermati con ulteriori esperimenti, sono riassunti nei grafici sottostanti.

La figura 13 mostra come il trattamento con metanandamide aumenti notevolmente il numero di cellule differenziate al giorno 3 rispetto al campione di controllo (sole cellule). L'uso dell'antagonista selettivo per il CB1 (am251) non sembra influire sul differenziamento: i valori osservati sono infatti paragonabili a quelli del controllo. Il trattamento con l'am630 invece, (antagonista del CB2), causa parziale aumento del numero di cellule differenziate.



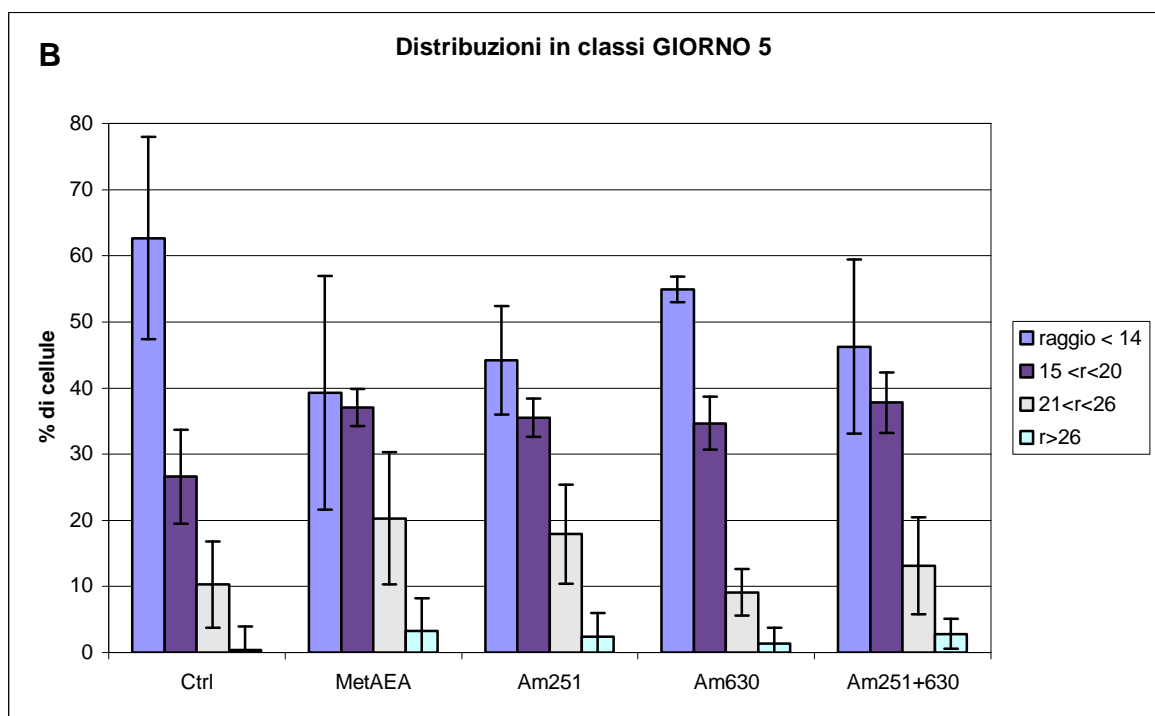
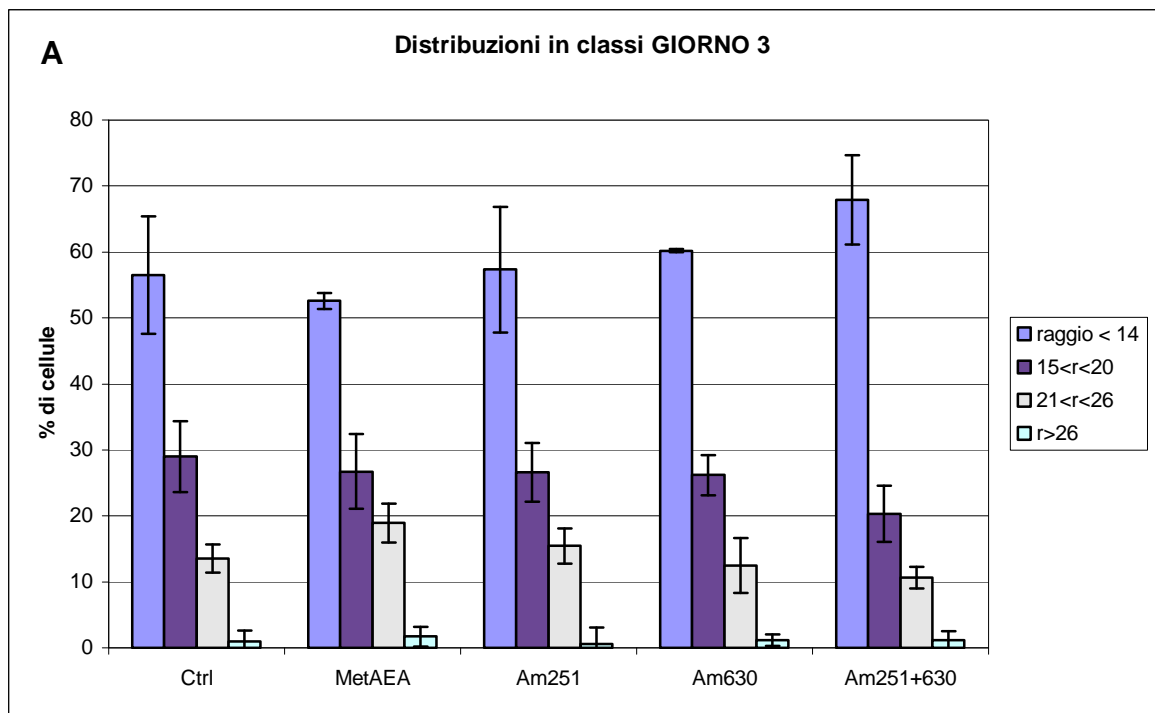
**FIG. 13 ENDOCANNABINOIDI E DIFFERENZIAMENTO:** in figura sono stati riportati i grafici ottenuti dall'analisi delle conte effettuate al giorno 3 del differenziamento. I campioni sono stati trattati, dove indicato, con: R-1 metanandamide 10  $\mu$ M (MetAEA); AM251 e AM630, ciascuno 1  $\mu$ M, inibitori selettivi di CB1 e CB2 rispettivamente; Ctrl= controllo (sole cellule). Le barre di errore mostrano le deviazioni standard ottenute da 3 diversi esperimenti.

Al 5 giorno del differenziamento invece (figura 14) si osserva ancora un aumento (inferiore rispetto al terzo giorno) del numero di cellule differenziate in presenza di metanandamide. Gli antagonisti, sia quando utilizzati singolarmente che insieme, sembrerebbero ridurre il numero di cellule differenziate rispetto al campione di controllo (sole cellule).



**FIG. 14 ENDOCANNABINOIDI E DIFFERENZIAMENTO:** in figura sono stati riportati i grafici ottenuti dall'analisi delle conte effettuate al quinto giorno del differenziamento. I campioni sono stati trattati, dove indicato, con: R-1 metanandamide 10  $\mu$ M (MetAEA); AM251 e AM630, ciascuno 1  $\mu$ M, inibitori selettivi di CB1 e CB2 rispettivamente; Ctrl= controllo (sole cellule). Le barre di errore mostrano le deviazioni standard ottenute da 3 diversi esperimenti.

I dati ottenuti come precedentemente descritto, sono stati utilizzati per ottenere ulteriori informazioni: suddividendo le cellule considerate in classi differenti per le dimensioni dei raggi cellulari, abbiamo ottenuto i grafici di seguito riportati.



**FIG. 15 ENDOCANNABINOIDI E DIFFERENZIAMENTO**-analisi dei dati con suddivisione in classi: in figura sono stati riportati i grafici ottenuti dall'analisi delle conte effettuate al terzo (A) e quinto (B) giorno del differenziamento. I campioni sono stati trattati, dove indicato, con: R-1 metanandamide 10  $\mu$ M (MetAEA); AM251 e AM630, ciascuno 1  $\mu$ M, inibitori selettivi di CB1 e CB2 rispettivamente; Ctrl= controllo (sole cellule). Le cellule sono state suddivise in classi (come indicato in legenda), a seconda delle dimensioni dei loro raggi. Le barre di errore mostrano le deviazioni standard ottenute da 3 diversi esperimenti.



Il pannello A (fig. 15) mostra che la distribuzione in classi al giorno 3 si equivale in quasi tutti i campioni; non compaiono infatti differenze significative se non nel campione trattato con metAEA dove si osserva l'aumento di cellule grandi (differenziate), con  $21 < r < 26$  ed  $r < 26$ , e riduzione delle cellule più piccole ( $r < 20$ ). Al giorno 5 (fig 15 - B) è invece possibile osservare che il trattamento con metanandamide riduce notevolmente il numero di cellule con raggio  $< 14 \mu\text{m}$  (barra azzurra), favorendo invece l'aumento del numero di cellule con raggio maggiore (e quindi differenziate), presenti nelle altre tre classi. Un andamento analogo si verifica, sempre al quinto giorno, nei campioni trattati con am251 e am251 + am630. Il solo antagonista di CB2 invece, sembrerebbe ridurre solo marginalmente le cellule piccole, favorendo un lieve aumento di cellule con  $15 < r < 20$  (barra viola).

## 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*).

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.

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); eventi chiave che accompagnano e caratterizzano questa fase di maturazione sono l'ingrossamento del citoplasma e l'acquisizione di marker cellulari specifici. Il mio primo obiettivo è stato quindi quello di valutare che le cellule utilizzate differenziassero correttamente; in figura 8 mostro come sia evidente l'aumento del diametro cellulare (e quindi l'avvenuto differenziamento) dal giorno 0 (A) al quinto (B). Come già detto durante il differenziamento in megacariociti vengono anche acquisiti ed espressi marker specifici, come l'integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , che possono essere utilizzati come indici dell'avvenuto processo differenziativo: dalla figura 7 si evince come i megacariociti

al terzo e quinto giorno di coltura in terreno arricchito, esprimano progressivamente maggiori livelli di proteina (presente anche nelle piastrine murine).

Successivamente ho indagato 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 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 9 sia CB1 (A) che CB2 (B) sono espressi nelle varie fasi del differenziamento considerate. Il pannello 9.c, colorato con un anticorpo anti-actina, mostra che una maggior quantità di lisato è stato caricato al terzo giorno di differenziamento: questo non ci permette di fare speculazioni su variazioni di espressione nel tempo ma risulta comunque evidente la presenza delle proteine esaminate.

Esperimenti analoghi sono stati condotti anche su lisati di piastrine ottenute da sangue intero di topo: la fig. 10 evidenzia la presenza del solo CB1 (CB2 non è invece rilevabile).

Per valutare se gli endocannabinoidi svolgano un ruolo nel differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche murine verso la linea megacariocitaria, ho condotto preliminari esperimenti pilota, utilizzando un grossolano marcatore del differenziamento megacariocitario: l'aumento delle dimensioni cellulari. Per questo tipo di esperimenti, le cellule staminali ematopoietiche sono state indotte al differenziamento e opportunamente trattate, fotografate e analizzate per le loro dimensioni cellulari ai diversi giorni del differenziamento.

La metanandamide (metAEA), analogo sintetico e più stabile dell'anandamide, è stata scelta tra gli endocannabinoidi perché dati riportati in letteratura mostravano un suo coinvolgimento (a differenza del 2-AG) nel differenziamento cellulare e poiché agisce preferenzialmente mediante il CB1 (che nei nostri dati di real-time era molto espresso, soprattutto nelle ultime fasi del differenziamento considerate).

Dai dati in nostro possesso il trattamento con metanandamide (Met-AEA) aumenta il numero di cellule differenziate sia al giorno 3 (fig. 13) che, in minor misura, al giorno 5 (fig. 14), suggerendo un potenziale ruolo degli endocannabinoidi nel processo differenziativo. È particolarmente interessante sottolineare che l'uso della Met-AEA causa una redistribuzione delle cellule nelle classi considerate: al giorno 3 (fig 15.a) favorisce l'aumento di cellule grandi (differenziate), con  $21 < r < 26$  ed  $r < 26$ , riducendo le cellule più piccole ( $r < 20$ ).

Al quinto giorno del differenziamento (fig 15 b) si osserva una considerevole diminuzione delle cellule più piccole ( $r < 14$ ), con evidente aumento delle cellule più grosse presenti in tutte le altre classi.

L'antagonista sintetico del recettore cannabico di tipo 1 (am251) non sembra modulare il differenziamento nelle fasi iniziali: al giorno 3 il numero di cellule differenziate è infatti paragonabile al controllo (fig. 13) ma, più tardivamente (giorno 5 – fig. 14), diminuisce. Questa prima osservazione ci permette di ipotizzare il coinvolgimento di CB1 nelle ultime fasi del differenziamento considerate e in particolare potrebbe secondo noi servire per limitare quantitativamente il processo differenziativo (meno cellule differenziate), ma potenziarlo qualitativamente (le poche cellule che differenziano, lo fanno meglio). Questa teoria trova conferma sia nell'aumento di espressione genica di CB1 nel tempo (dati di real-time in figura 11), che nel grafico riportato in figura 15a e 15b: l'am251 causa redistribuzione nelle classi solamente al giorno 5 favorendo l'aumento di tutte le classi di cellule grandi, a discapito di quelle più piccole ( $r < 14$ ).

Il ruolo di CB2 sembra invece essere differente; in questo caso ipotizziamo che nelle fasi iniziali (giorno 3) il recettore medi un segnale di inibizione del differenziamento: l'uso dell'antagonista favorisce infatti l'aumento di cellule differenziate (fig.13). Anche l'espressione genica del recettore convalida questa ipotesi: al giorno 3 si assiste infatti ad una significativa diminuzione di espressione rispetto al giorno 0 (fig. 12). Nelle fasi tardive invece il CB2 sembra comportarsi in modo analogo al CB1: si osserva una diminuzione del numero di cellule differenziate (fig. 14) ma anche la redistribuzione in classi con andamento simile a quello sopradescritto per il CB1 (fig. 15).

In futuro vorrei innanzitutto valutare l'eventuale coinvolgimento di un terzo recettore, TRPV-1, che in letteratura è riportato essere bersaglio dell'anandamide. Sarebbero poi necessari esperimenti per chiarire il meccanismo di azione della met-AEA stessa: attraverso quale dei recettori considerati agisce ed eventualmente se sia necessaria una sua metabolizzazione. Come già detto gli esperimenti riportati sono studi pilota che devono quindi essere riconfermati analizzando, oltre che l'aumento di dimensioni cellulari, anche altri marcatori del differenziamento quali l'aumento della ploidia e l'espressione di marker specifici (CD41, GPVI e GPIX). In futuro si potrebbe inoltre valutare il ruolo di altri endocannabinoidi (per es. il 2-AG) ed infine studiare 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., Vlodavsky, 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 Haematolog.* 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, Stohman 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. & Vlodaysky, 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, Járai 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.
- Pertwee, R.G., Ross, R.A. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; **66**:101-21.
- 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, S. Thrombocytopoiesis – analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megakaryocytes. *Journal of Cell Biology*. 1984; **99**:390–402.

## ATTIVITA' FORMATIVA

### SEMINARI FREQUENTATI NEL CORSO DEL PRIMO ANNO DI DOTTORATO:

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 è 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**

SEMINARI FREQUENTATI NEL CORSO DEL SECONDO ANNO DI DOTTORATO:

5 dicembre 2008

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

**"Production of bio-farmaceuticals in plants" – Prof. Luca Santi**

12 dicembre 2008

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

**"Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche." – Antonio Uccelli**

18 dicembre 2008

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

**"Patologia della radice aortica: dalla clinica alla biologia molecolare"- Prof. Giuseppe Faggian**

9 gennaio 2009

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

**"La malattia celiaca" - Riccardo Troncone**

27 gennaio 2009

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

**"Interazioni geni - ambiente nella eziologia della sclerosi multipla: studi sui gemelli" - Marco Salvetti**

Giovedì 29 gennaio 2009

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

**"Indicazioni e limiti della Citologia Agoaspirativa Tiroidea" - Dott.ssa Agnese Assi**

Martedì 10 febbraio 2009

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

**"Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica" - Antonio Musarò**

Giovedì 12 febbraio 2009

Auletta Riunioni al piano terra della Facoltà di Medicina, Chirurgia e Scienze della Salute, in via Solaroli 17 - Novara

**"Ruolo dei polimorfismi dei geni della pigmentazione nell'induzione di mutazioni somatiche nei melanomi" - Prof.ssa G. Bianchi Scarrà**

Martedì 13 gennaio 2009

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

**"Porpora trombocitopenica autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici" - Francesco Zaja**

Giovedì 19 febbraio

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

**"The use of cytomegalovirus as a novel vaccine vector for Simian Immunodeficiency Virus" - Prof. Jay A. Nelson**

Venerdì 20 febbraio 2009

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

**"When a fine tuner of signaling pathways becomes a dangerous amplifier: the case of the Prollyl-isomerase Pin1 in cancer" - Prof. Giannino Del Sal,**

Mercoledì 25 febbraio 2009

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

Discussione anatomoclinica - CONFERENZA SU: **"Linee guida per il riscontro diagnostico sulla morte improvvisa" - Prof. Gaetano Thiene**

Giovedì 26 febbraio 2009

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

**"Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica" - Prof. Mauro Maccarrone,**

Mercoledì 18 marzo 2009

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

**"Cellule staminali tumorali: implicazioni terapeutiche"- Prof. Giorgio Stassi**

Mercoledì 18 marzo 2009

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

**"La proteomica: un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine"- Prof. Piero Pucci**

Giovedì 19 marzo 2009

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

**"Le nanotecnologie applicate alla medicina" - Prof. G. Peluso**

Lunedì 23 marzo 2009

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

**"Enzima P e il Social Network per l'Innovazione" - Dr. Salvatore Timpanaro**

Giovedì 26 marzo 2009

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

**"Regulation of integrin functions in vascular systems" - Federico Bussolino, MD, PhD,**

Giovedì 9 aprile 2009

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

**"I bioreattori nella Medicina Rigenerativa:dalla ricerca alla realtà di una start-up" - Dott.ssa Sara Mantero**

Mercoledì 22 aprile 2009

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

**"Patologia dei tumori cerebrali. Recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi" - Davide Schiffer Ph.D. M.D.**

Martedì 28 aprile 2009

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

**"Polycystin-1, the product of the PKD1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD), is an orphan receptor regulating cell migration and polarity" - Dott.ssa Anna Boletta**

Giovedì 30 aprile 2009

Aula Magna della Facoltà di Medicina, Chirurgia e Scienze della Salute, in via Solaroli 17 - Novara  
**"Polarized inflammation in tumour development" - Prof. Antonio Sica**

Martedì 5 maggio 2009

Aula Magna della Facoltà di Medicina, Chirurgia e Scienze della Salute, in via Solaroli 17 - Novara  
**"Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo" - Prof. Amedeo Columbano**

Mercoledì 6 maggio 2009

Aula Magna della Facoltà di Medicina, Chirurgia e Scienze della Salute, in via Solaroli 17 - Novara  
**"Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: design of stimuli-responsive nanomaterials <br> for cancer diagnosis and therapy" - Dr.ssa Barbara Palazzo**

Martedì 12 maggio 2009

Aula Magna della Facoltà di Medicina, Chirurgia e Scienze della Salute, in via Solaroli 17 - Novara  
**"Ipertecolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana" - Prof. Giuseppe Poli**  
**"Neurotossicità delle proteine 'misfolded' nelle malattie del motoneurone" - Prof. Angelo Poletti**

Giovedì 14 maggio 2009

Auletta Riunioni al piano terra della Facoltà di Medicina, Chirurgia e Scienze della Salute, in via Solaroli 17 - Novara  
**"Functional Genomics of Brain" - Prof. Stefano Gustincich**

Giovedì 14 maggio 2009

Aula Magna della Facoltà di Medicina, Chirurgia e Scienze della Salute, in via Solaroli 17 - Novara  
**"Tecniche di split liver nel trapianto di fegato adulto e pediatrico" - Prof. V. Corno**

Giovedì 21 maggio 2009

Aula D12, della Facoltà di Medicina, Chirurgia e Scienze della Salute, in via Solaroli 17 - Novara  
**"Il Doping ormonale: aspetti clinici e legislativi" - Prof. L. Di Luigi**

Mercoledì 3 giugno 2009

Aula Magna della Facoltà di Medicina, Chirurgia e Scienze della Salute, in via Solaroli 17 - Novara  
**"Role of Raf in tumorigenesis"- Prof. M. Baccharini**

Mercoledì 10 giugno 2009

Aula Magna della Facoltà di Medicina, Chirurgia e Scienze della Salute, in via Solaroli 17 - Novara  
**"Marcatori molecolari nel carcinoma coloretale: dalla teoria alla pratica clinica"- Milo Frattini, MSc**

Lunedì 6 luglio 2009

Aula Magna della Facoltà di Medicina, Chirurgia e Scienze della Salute, in via Solaroli 17 - Novara  
**"Il Lupus Eritematoso Cutaneo: quadro clinico ed immunopatologico"- Prof. E. Berti**



# **SEZIONE 2**

## **CORSI FREQUENTATI:**

### **– Primo anno di dottorato :**

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 la Radioprotezione

Data: 10-07-2008

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

Corso: lingua inglese

Insegnante: *Colin Irving Bell*

### **– Secondo anno di dottorato :**

Corso: lingua inglese

Insegnante: *Professoressa Mara Giordano*

## **CONGRESSI FREQUENTATI:**

### **– Primo anno di dottorato :**

Congresso: CNBX

Sede: Perugia

Data: 17-19 settembre 2008

### **– Secondo anno di dottorato :**

Congresso: 22a RIUNIONE NAZIONALE “A. Castellani” DEI DOTTORANDI DI RICERCA IN DISCIPLINE BIOCHIMICHE”

Sede: Brallo di Pregola

Data: 9-12 giugno 2009

## **COMUNICAZIONI A CONGRESSI:**

### **– Primo anno di dottorato :**

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 $\beta$  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

- Secondo anno di dottorato :

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

Congresso: Platelets 2008: 5th International Symposium.

Sede: Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA.

Data: 15-18 ottobre 2008

Titolo: "Estrogen and its precursor dehydroepiandrosterone directly affect platelet function with opposite effects"

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

Congresso: Platelets 2008: 5th International Symposium.

Sede: Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA.

Data: 15-18 ottobre 2008

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

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

Congresso: 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology

Sede: Shanghai

Data: 2-7 Agosto 2009

Titolo: "Inhibition of thrombin induced platelet aggregation by dehydroepiandrosterone-sulfate"

Autori: Rastoldo Alessandro, Sarasso Chiara, **Bagarotti Alessandra**, Di Vito Clara, Bertoni Alessandra, Sinigaglia Fabiola

Congresso: 54th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Sede: Catania

Data: 23-27 Settembre 2009

Titolo: "Analysis of expression of classical estrogen receptors and gpr30 during megakaryoblastic differentiation"

Autori: C. Di Vito, S. Bergante, A. Rastoldo, **A. Bagarotti**, A. Bertoni, F. Sinigaglia

**ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO:**

Baldassarri S, Bertoni A, **Bagarotti A**, Sarasso C, Zanfa M, Catani MV, Avigliano L, Maccarrone M, Torti M, Sinigaglia F. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB1/CB2 receptors. *J Thromb Haemost.* 2008 Oct; 6(10):1772-9

---