

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



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

**Relazione 2° anno**

**RUOLO DEGLI ESTROGENI NEL  
DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOCITARIO**

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

# ***SEZIONE 1***

## **RISULTATI SCIENTIFICI**

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>4</b>
1.1 I MEGACARIOCITI.....	4
1.2 LA MEGACARIOPOIESI.....	5
1.3 LA REGOLAZIONE DELLA MEGACARIOPOIESI E DELLA TROMBOPOIESI.....	8
1.4 LA FORMAZIONE DELLE PIASTRINE.....	10
1.5 LE PIASTRINE.....	14
1.6 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI.....	15
1.7 SNAI1 E SNAI2.....	18
<b>2. SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>20</b>
<b>3. METODI .....</b>	<b>22</b>
3.1 LINEE CELLULARI E COLTURE.....	22
3.2 ESTRAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI DA SANGUE DI CORONE OMBELICALE E GENERAZIONE <i>IN VITRO</i> DI MEGACARIOCITI.....	23
3.3 ESTRAZIONE DELL’RNA, QUANTIFICAZIONE E RETROTRASCRIZIONE.....	24
3.4 PCR.....	24
3.5 REAL TIME PCR.....	25
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>26</b>
4.1 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI IN LINEE MEGACARIOBLASTICHE STIMOLATE CON PMA.....	26
4.2 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI IN LINEE MEGACARIOBLASTICHE STIMOLATE CON TPO.....	28
4.3 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI IN LINEE MEGACARIOBLASTICHE STIMOLATE CON 17 $\beta$ -ESTRADIOLO.....	30
4.4 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI IN LINEE MEGACARIOBLASTICHE STIMOLATE CON PMA E 17 $\beta$ -ESTRADIOLO.....	31
4.5 I RECETTORI PER GLI ESTROGENI NEL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOCITARIO.....	33
4.6 SNAI1 E SNAI2 NEL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOBLASTICO.....	35
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>37</b>
5.1 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI NEL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOBLASTICO.....	37
5.2 SNAI1 NEL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOBLASTICO.....	40
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>42</b>
<b>7. ATTIVITÀ FORMATIVA.....</b>	<b>50</b>

# 1. INTRODUZIONE

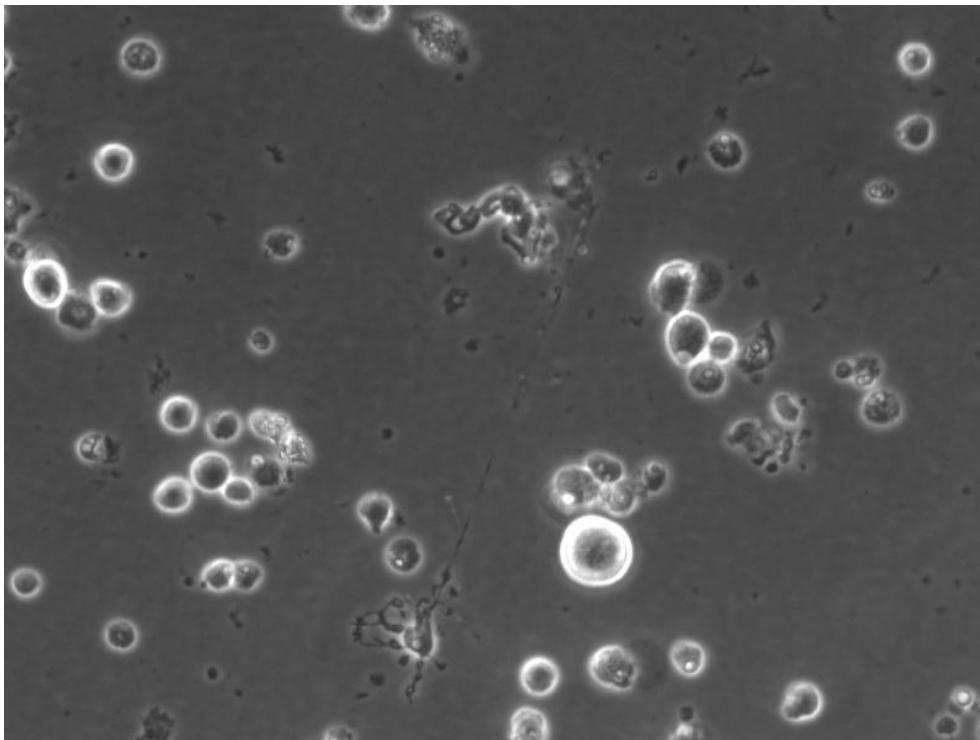
## 1.1 I MEGACARIOCITI

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 diversi stadi fino a raggiungere l'emopoiesi adulta a partire dal 4° mese di gestazione (Golde, 1991). Nelle ultime fasi di vita fetale e nella vita adulta gli elementi corpuscolari del sangue vengono prodotti esclusivamente 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).

Per quanto riguarda il 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 di membrana.

CD34 è l'antigene distribuito sulla superficie di cellule staminali totipotenti, cellule emopoietiche immature e sull'endotelio. Le cellule CD34+ 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.

L'espressione del CD34 nel differenziamento megacariocitario 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 del complesso glicoproteico IIb/IIIa, CD42a, CD42b e CD51 del complesso glicoproteico Ib-V-IX (Majka et al, 2001; Poujol et al, 2002). Negli stadi terminali del differenziamento megacariocitario gioca inoltre un ruolo importante il recettore per il collagene, GPVI. 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 (Berlanga et al, 2000).

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 µm, 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 neoformate.

Una delle caratteristiche più importanti del megacariocita maturo è la formazione di un sistema di demarcazione di membrana che costituisce una complessa rete di cisterne appiattite e tubuli membranosi in diretto contatto con la membrana plasmatica cellulare, che si ritiene 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 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 indirizzano il loro contenuto all'interno del sistema canalicolare aperto 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 and 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). 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).

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.

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.

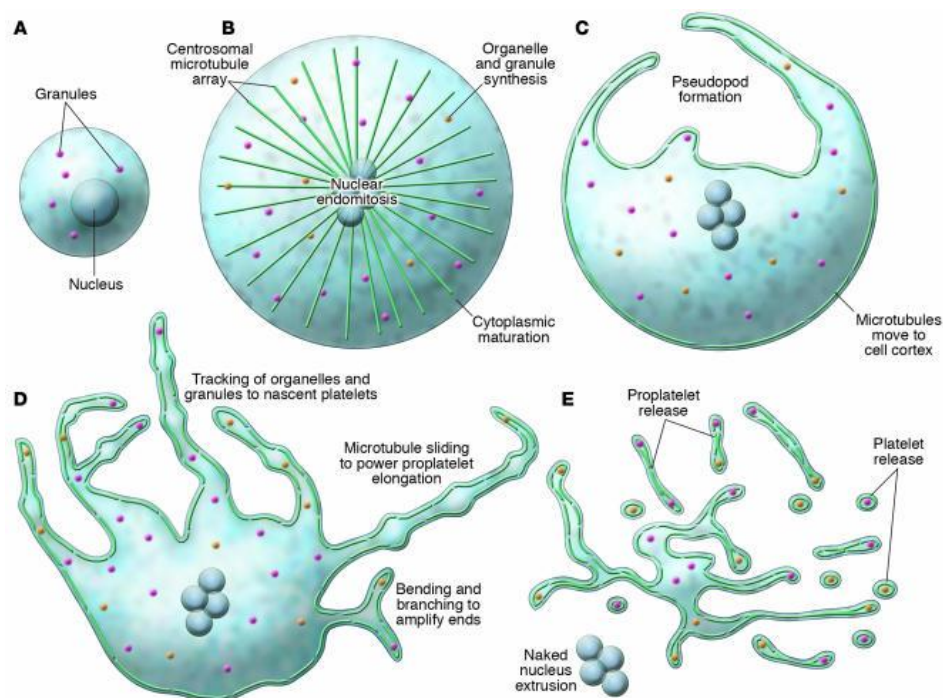
Oltre ai regolatori positivi della megacariopoiesi esistono anche fattori che inibiscono lo sviluppo in senso megacariocitario, tra cui il transforming growth factor  $\beta$ 1 (Kuter et al, 1992), PF4 e IL-4.

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 che 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 (Figura 2).



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

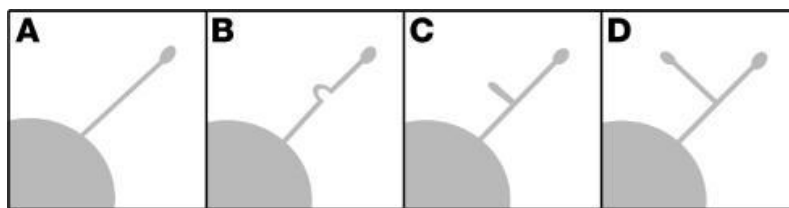
La teoria rudimentale della formazione delle propiastri è stata sviluppata da Becker e DeBruyn nel 1976. Oggi tale teoria è stata confermata e migliorata da studi sia *in vitro* (Schmitt et al, 2001), grazie alla scoperta della trombopoietina, che *in vivo* (Choi et al, 1995b), in diversi modelli animali 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 propiastri sono generate dalla riorganizzazione del sistema membranoso interno di megacariociti maturi e mediano la generazione delle vere e proprie piastrine. La formazione delle

propiastrine 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).*

La generazione delle propiastriane prosegue con una continua diffusione di 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 o estrusione (Patel et al, 2005).

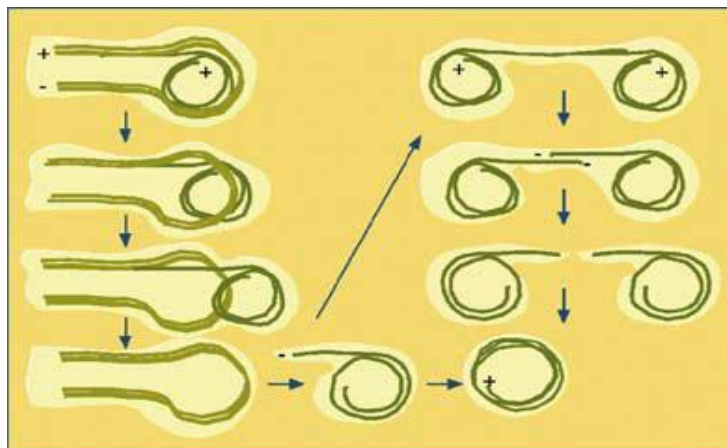
Le piastrine formatesi alle estremità delle propiastriane devono accumulare organelli e granuli, che migrano lungo i microtubuli dal corpo cellulare alle propiastriane dove, muovendosi bidirezionalmente, vengono catturati dalle piastrine nascenti (Richardson et al, 2005).

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).

Una volta in prossimità del sinusoido, 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 sinusoido che successivamente vengono frammentati in singole piastrine nel circolo sanguigno. È stato proposto che nel rilascio delle piastrine dalla propiastrina 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 propiastriane.

(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 propiastriane, 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 propiastriane (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 della trascrizione (Koide et al, 2007).

Il legame dell'estrogeno al recettore induce una modificazione conformazionale 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 target 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 (Manavathi et al, 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 ciclastasi, 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 (E<sub>2</sub>) 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, 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.

## 1.7 SNAI1 e SNAI2

SNAI1 e SNAI2, detti anche Snail e Slug rispettivamente, sono due fattori trascrizionali membri della famiglia di SNAIL il cui compito principale è quello di reprimere la trascrizione di geni target. Essi sono costituiti da una porzione C-terminale altamente conservata, che contiene da 4 a 6 zinc-finger Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>, deputata al legame al DNA a livello della sequenza 5'-CAGGTG-3' dei geni target (Nieto 2002). L'attività repressoria di tali fattori trascrizionali dipende inoltre da due regioni presenti a livello della porzione N-terminale: SNAG (Snail/Gfi) e CtBP (Carboxy-terminal Binding Protein) (Manzanares et al, 2001).

Per quanto riguarda SNAI1 inoltre la sua attività repressoria sembra inoltre influenzata dalla sua localizzazione cellulare (Dominguez et al, 2003). Infatti se la proteina risulta fosforilata ad opera di GSK-3 $\beta$ , si ha una sua prevalente localizzazione a livello cellulare ed un maggior riconoscimento di Snail da parte del proteasoma.

SNAI1 e SNAI2 presentano diverse funzioni. Essi infatti giocano un ruolo importante nella formazione del mesoderma e della cresta neurale, regolando l'EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) tramite la downregolazione dell'espressione di marcatori epiteliali, come per esempio l'E-caderina (Nieto, 2002). Snail e Slug partecipano anche alla regolazione della sopravvivenza cellulare, inibendo la trascrizione di geni proapoptotici (Vega et al, 2004). In particolare Pérez-Losanda e colleghi (Pérez-Losanda et al, 2003) hanno dimostrato che nei topi null per SNAI2 si ha un aumento dell'apoptosi dei progenitori ematopoietici midollari indotta da radiazioni (Pérez-Losada et al, 2003). Un altro processo importante in cui interviene SNAI1 è la regolazione della divisione cellulare, attraverso il controllo della progressione da G1 ad S (Vega et al, 2004). Inoltre sembra essere coinvolto nel controllo della poliploidia in diversi tessuti (Nieto, 2002). In particolare mSNA, l'omologo murino di SNAI1, risulta essere espresso nei precursori delle cellule giganti del trofoblasto, ma è downregolato nel corso del differenziamento. La sua overespressione sembra infatti inibire l'iniziale transizione verso l'endomitosi (Nakayama et al, 1998). E' stato inoltre dimostrato che cellule HEL overesprimenti Esg, l'omologo di Drosophila di SNAI1, stimulate con PMA non vanno in contro ad endomitosi, sebbene presentino aumentati livelli di CD61, marcatore di differenziamento megacariocitario, e diminuiti livelli di glicoforina A, marcatore di differenziamento eritroide (Ballester et al, 2001).

Diversi studi hanno inoltre dimostrato che sia Snail che Slug sono in grado di rispondere agli estrogeni. Infatti SNAI1 presenta un elemento di risposta agli estrogeni classico, mentre SNAI2 ne

presenta uno parziale (Ye Y et al, 2008). Inoltre ER $\alpha$  sembra essere coinvolto nell'EMT e nella downregolazione dell'E-caderina, suggerendo quindi un potenziale ruolo di tale recettore nell'aumento dell'espressione di Snail e Slug (Park SH et al, 2008). Al contrario ER $\beta$  sembra bloccare la downregolazione estrogeno-mediata dell'E-caderina, inibendo l'espressione di SNAI1 e SNAI2 (Ding et al, 2006).

## 2. SCOPO DEL LAVORO

Gli eventi responsabili della maturazione dei megacariociti, della formazione di propiastri 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 propiastri e che tale meccanismo è accentuato in presenza di estrogeno (Nagata et al, 2003).

Diversi 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.

Abbiamo inoltre pensato di valutare come i recettori degli estrogeni intervengano nel controllare l'espressione di SNAI1 e SNAI2 durante la maturazione dei megacariociti.

### 3. 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 1640 + GlutaMAX 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 500 x g. 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 1640 + GlutaMAX al 15% 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 2x10<sup>5</sup> e 4x10<sup>5</sup> cellule/ml. Per il passaggio della coltura, le cellule vengono trattate con tripsina, trasferite in provette di polipropilene e centrifugate a temperatura ambiente per 6 minuti a 500 x g. Al termine della centrifugazione il surnatante viene eliminato, le cellule vengono lavate con PBS, centrifugate e risospese in RPMI di fresca preparazione al 15% di FBS inattivato.

Campioni da 8x10<sup>5</sup> cellule/ml sia di HEL che di MEG01 sono stati stimolati in terreno RPMI al 15% di FBS inattivato addizionato con TPO 10 ng/ml o con PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) 100 nM per 72 ore a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>. Le due linee cellulari sono state inoltre stimolate con 17β-estradiolo 100 nM in assenza ed in presenza di PMA per 24 e 72 ore in terreno RPMI senza rosso fenolo al 15% di FBS inattivato.

Per quanto riguarda le cellule stimulate con PMA, terminata l'incubazione l'avvenuto differenziamento in entrambe le linee cellulari è stato studiato valutando l'espressione del complesso GPIIb-IIIa. A tale scopo è stato usato un anticorpo specifico per la GPIIb (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 500 x g, risospesi in 1 ml di PBS1X 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.

Le cellule mononucleate sono state separate stratificando il sangue, diluito 1:2 in PBS1X, 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 PBS1X 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 PBS1X. Successivamente le staminali CD34 positive sono state isolate 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 ESTRAZIONE DELL'RNA, QUANTIFICAZIONE E RETROTRASCRIZIONE

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

750 ng di RNA per reazione sono stati retrotrascritti utilizzando QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) in un volume finale di 20 µl secondo il protocollo fornito dall'azienda produttrice.

### 3.4 PCR

Per quanto riguarda SNAI1 e SNAI2 la loro espressione nelle cellule HEL è stata valutata 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 32 cicli a 94° C per 30 secondi, 55° C 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 seguenti primers:

	PRIMER	AMPLICONE	T. APPAIAMENTO	CICLI
<b>GAPDH</b>	FOR 5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTT-3' REV 5'- TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'	245 bp	55°C	32
<b>SNAI1</b>	FOR 5'-ACCCACACTGGCGAGAAG -3' REV 5'- GGGCAGGTATGGAGAGGAA -3'	230 bp	55°C	32
<b>SNAI2</b>	FOR 5'- AGAACTCACACGGGGGAGA -3' REV 5'- GCTTCGGAGTGAAGAAATGC-3'	246 bp	55°C	32



### 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 $\alpha$ , GPR30 e SNAI1 (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 secondo anno di Dottorato sono quindi andata ad indagare il profilo di espressione di ER $\alpha$ , delle isoforme di ER $\beta$ , del GPR30, di SNAI1 e SNAI2 durante il differenziamento megacariocitario.

### 4.1 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI IN LINEE MEGACARIOBLASTICHE STIMOLATE CON PMA

8X10<sup>5</sup> cellule/ml sono state coltivate per 72 ore in terreno RPMI al 15% di siero inattivato in presenza di PMA 100 nM che induce il differenziamento in senso megacariocitario delle cellule HEL e MEG01. Come controllo sono state usate le cellule non stimolate con aggiunta dello 0,01% di DMSO.

Terminata l'incubazione l'avvenuto differenziamento di HEL e MEG01 è stato studiato valutando mediante analisi citofluorimetrica l'espressione del CD41, proteina altamente espressa nelle piastrine e nei megacariociti maturi (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). 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.

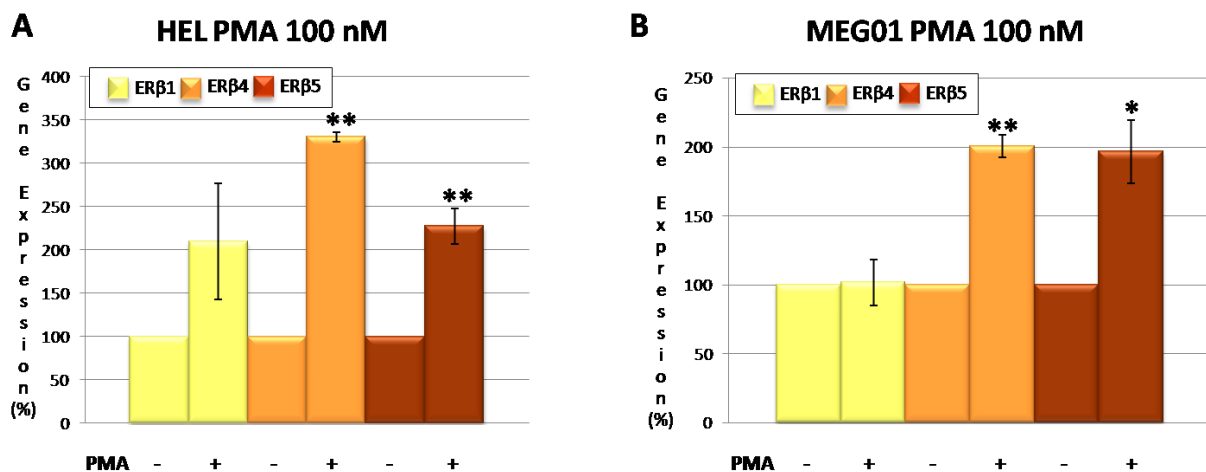
Successivamente è stato estratto l'RNA totale sia dalle cellule non differenziate che da quelle differenziate ed il cDNA derivato da retrotrascrizione è stato usato in real-time PCR per effettuare una quantificazione relativa di ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 4, ER $\beta$ 5 e GPR30.

L'espressione dei recettori in esame nelle cellule HEL e MEG01 non differenziate, usate come calibratore, è stata posta arbitrariamente uguale a 100 ed i relativi valori nelle cellule differenziate sono stati espressi come percentuale  $\pm$  SEM.

ER $\alpha$  e GPR30 non risultano essere espressi in entrambe le linee cellulari dopo stimolazione con PMA (dati non mostrati).

Per quanto riguarda invece le isoforme di ER $\beta$ , i risultati ottenuti indicano che nelle HEL differenziate l'espressione di ER $\beta$ 1 è di 209,5% $\pm$ 66,6 e di ER $\beta$ 4 è di 329,75% $\pm$ 5,4 e di ER $\beta$ 5 è di 227,2% $\pm$ 20,2 rispetto al calibratore (Figura 5A). Per ER $\beta$ 4 e ER $\beta$ 5 la differenza di espressione osservata tra cellule differenziate e non è risultata essere statisticamente significativa (\*\*p<0.01), mentre per ER $\beta$ 1 il dato ottenuto non risulta significativo.

Nelle MEG01 differenziate invece, si osserva una pressoché inalterata espressione di ER $\beta$ 1 (101,45% $\pm$ 16,5), mentre l'espressione di ER $\beta$ 4 e ER $\beta$ 5 nelle cellule stimulate con PMA risulta aumentata rispetto al calibratore, 200,55% $\pm$ 8,2 e 196,75% $\pm$ 22,9 rispettivamente. In entrambi i casi la differenza di espressione risulta essere statisticamente significativa (\*\*p<0.01 per ER $\beta$ 4 e \*p<0.05 per ER $\beta$ 5) (Figura 5B).



**Figura 5:** Real-time PCR

*Espressione delle isoforme di ER $\beta$  nelle cellule HEL (A) e nelle cellule MEG01 (B) differenziate con PMA. I risultati sono espressi come percentuale di espressione rispetto all'espressione nelle cellule non differenziate usate come calibratore (100%). Ogni campione è stato analizzato in triplicato. I valori sono espressi come media  $\pm$  SEM.*

## 4.2 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI IN LINEE MEGACARIOBLASTICHE STIMOLATE CON TPO

$8 \times 10^5$  cellule/ml sono state coltivate per 72 ore in terreno RPMI al 15% di siero inattivato in presenza od in assenza di TPO 10 ng/ml che induce il differenziamento in senso megacariocitario delle cellule staminali ematopoietiche ma non delle HEL e MEG01, infatti in citofluorimetria non è stata osservata alcuna variazione dell'espressione del CD41 (dati non mostrati).

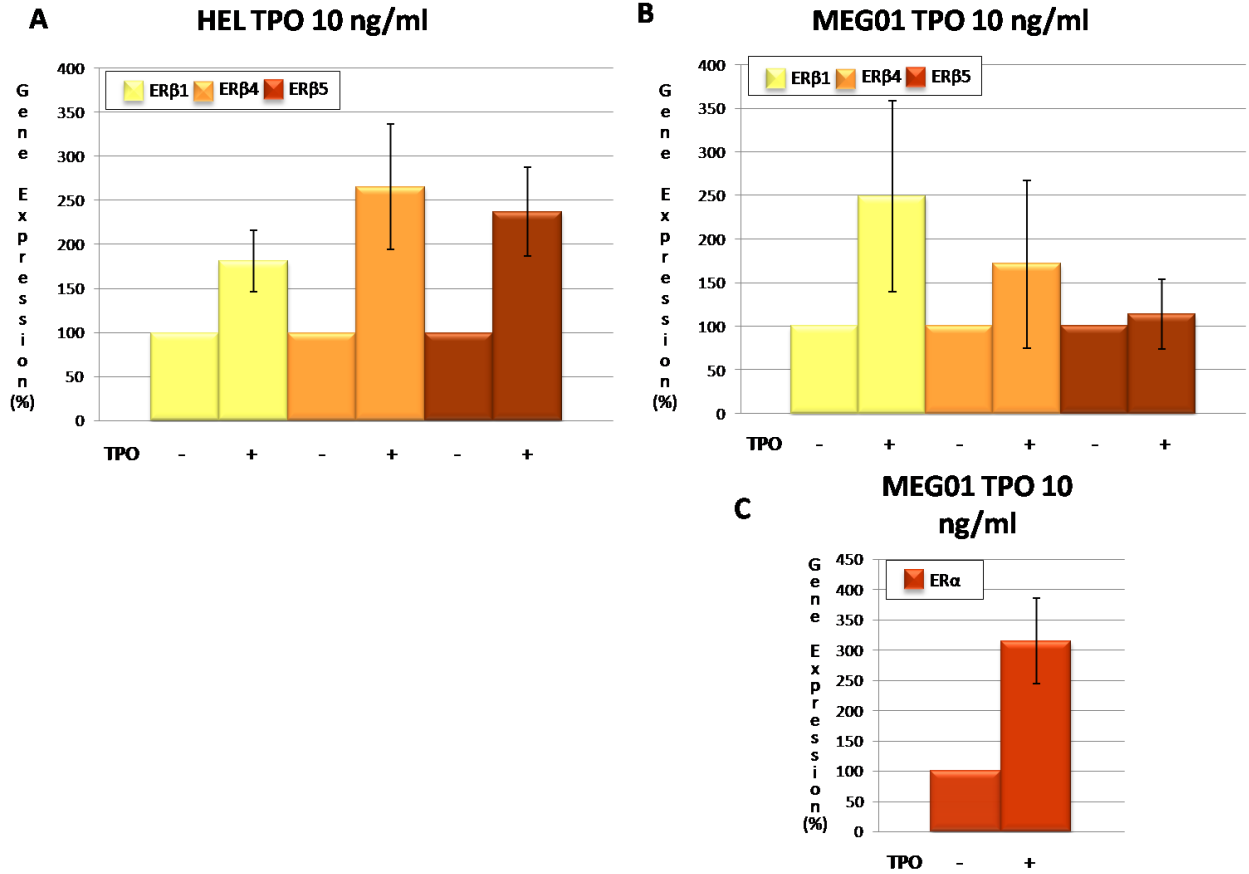
Successivamente è stato estratto l'RNA totale dalle cellule stimulate e non ed il cDNA derivato da retrotrascrizione è stato usato in real-time PCR per amplificare i trascritti di ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 4, ER $\beta$ 5 e GPR30 e successivamente è stata effettuata una quantificazione relativa dei trascritti prima e dopo lo stimolo con TPO.

L'espressione dei recettori in esame nelle cellule HEL e MEG01 non stimulate, usate come calibratore, è stata posta arbitrariamente uguale a 100 ed i relativi valori nelle cellule differenziate sono stati espressi come percentuale  $\pm$  SEM.

I dati ottenuti indicano che conseguentemente allo stimolo con TPO, il GPR30 non risulta essere espresso in entrambe le linee cellulari analizzate, mentre ER $\alpha$  sembra essere espresso solo nelle MEG01 (dati non mostrati).

I risultati ottenuti indicano che nelle HEL che hanno ricevuto lo stimolo l'espressione di ER $\beta$ 1 è di  $181,33\% \pm 34,7$  e di ER $\beta$ 4 è di  $265,67\% \pm 71,1$  e di ER $\beta$ 5 è di  $237,07\% \pm 50,2$  rispetto al calibratore (Figura 6A), le differenze riscontrate tuttavia non sembrano essere statisticamente significative.

Nelle MEG01 invece, si osserva una pressoché inalterata espressione di ER $\beta$ 5 ( $113,67\% \pm 39,95$ ), mentre l'espressione di ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 4 nelle cellule stimulate con TPO risulta aumentata rispetto al calibratore,  $249,2\% \pm 109,4$  e  $171,3\% \pm 95,96$  rispettivamente (Figura 6B). In entrambi i casi la differenza di espressione osservata non risulta essere statisticamente significativa. Per quanto riguarda infine ER $\alpha$ , la sua espressione sembra essere aumentata rispetto al calibratore ( $314,5\% \pm 70,7$ ) (Figura 6C).



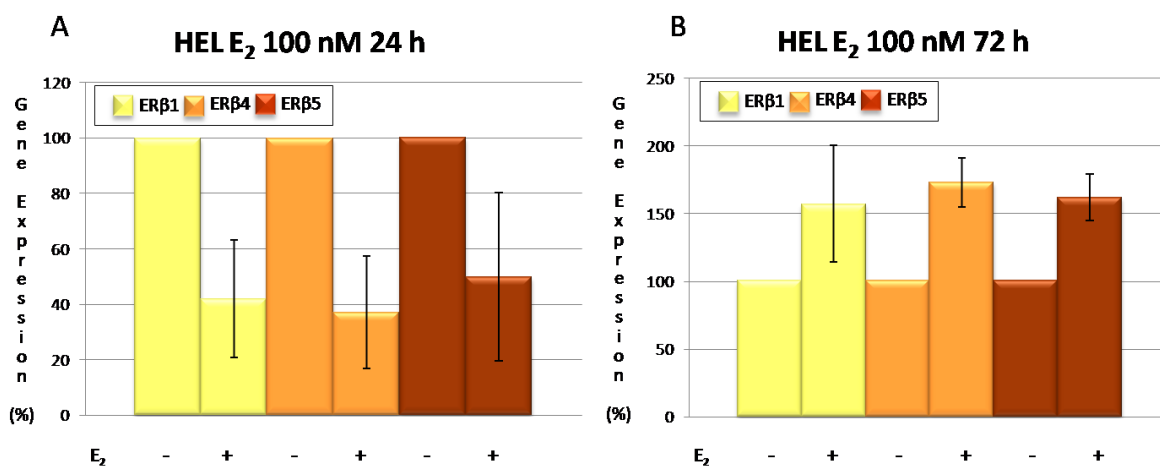
**Figura 6: Real-time PCR**

*Espressione delle isoforme di ERβ nelle cellule HEL (A) e nelle cellule MEG01 (B) e di ERα nelle cellule MEG01 differenziate con TPO (C). I risultati sono espressi come percentuale di espressione rispetto all'espressione nelle cellule non stimolate usate come calibratore (100%). Ogni campione è stato analizzato in triplicato. I valori sono espressi come media ± SEM.*

### 4.3 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI IN LINEE MEGACARIOBLASTICHE STIMOLATE CON 17 $\beta$ -ESTRADIOLO

8X10<sup>5</sup> cellule/ml sono state coltivate per 24 e 72 ore in terreno RPMI 1640 senza rosso fenolo in presenza od in assenza di 17 $\beta$ -estradiolo 100 nM. Dopo 1 ora dall'inizio dello stimolo è stato aggiunto il 15% di siero inattivato. Successivamente è stato estratto l'RNA totale dalle cellule stimulate e non ed il cDNA derivato da retrotrascrizione è stato usato in real-time PCR per amplificare i trascritti di ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 4, ER $\beta$ 5, su cui è stata effettuata una quantificazione relativa. L'espressione dei recettori in esame nelle cellule HEL e MEG01 non stimulate, usate come calibratore, è stata posta arbitrariamente uguale a 100 ed i relativi valori nelle cellule differenziate sono stati espressi come percentuale.

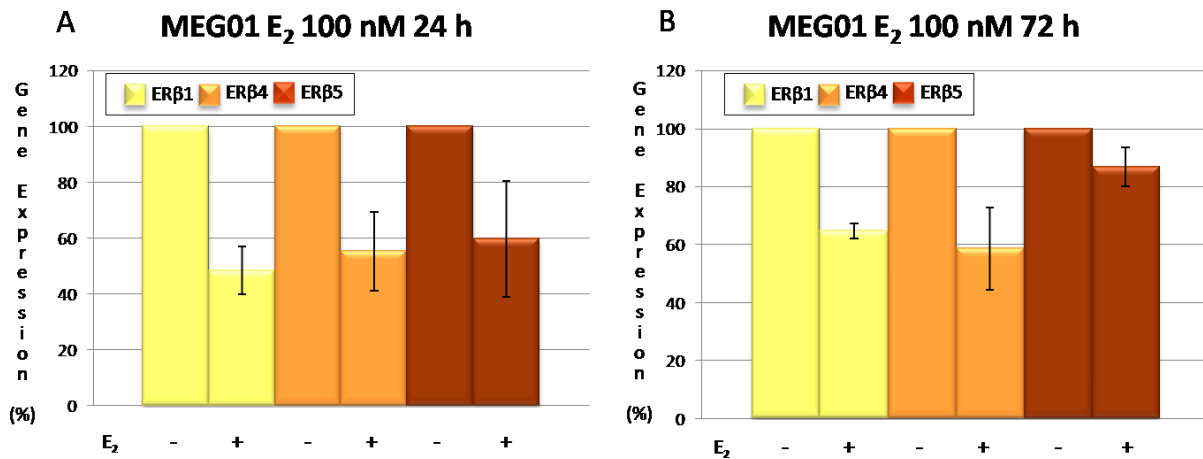
I risultati ottenuti indicano che nelle HEL stimulate per 24 ore l'espressione delle 3 isoforme in esame risulta diminuita, infatti essa è del 42% $\pm$ 21,2 per ER $\beta$ 1, del 37,1% $\pm$ 20,3 per ER $\beta$ 4 e del 49,8% $\pm$ 30,4 per ER $\beta$ 5 rispetto al calibratore (Figura 7A), mentre nelle HEL stimulate per 72 ore l'espressione delle isoforme di ER $\beta$  risulta aumentata: 157,25% $\pm$ 43,1 per ER $\beta$ 1, 173% $\pm$ 17,9 per ER $\beta$ 4, 162,05% $\pm$ 17,1 per ER $\beta$ 5 (Figura 7B).



**Figura 7:** Real-time PCR

*Espressione delle isoforme di ER $\beta$  nelle cellule HEL stimulate con 17 $\beta$ -estradiolo per 24 h (A) e 72 h (B). I risultati sono espressi come percentuale di espressione rispetto all'espressione nelle cellule non stimulate usate come calibratore (100%). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.*

Anche nelle MEG01 si osserva una diminuzione dell'espressione delle isoforme di ER $\beta$  dopo uno stimolo di 24 ore, infatti l'espressione di ER $\beta$ 1 è del 48,4% $\pm$ 8,6, di ER $\beta$ 4 è del 55,35% $\pm$ 14,2 e di ER $\beta$ 5 è di 59,65% $\pm$ 20,7 rispetto al calibratore (Figura 8A). Nelle MEG01 stimulate per 72 ore l'espressione ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 4, ER $\beta$ 5 risulta ancora diminuita: 64,7% $\pm$ 2,7, 58,65% $\pm$ 14,2 e 86,8% $\pm$ 6,7 rispettivamente (Figura8B).



**Figura 8:** Real-time PCR

*Espressione delle isoforme di ER $\beta$  nelle cellule MEG01 stimulate con 17 $\beta$ -estradiolo per 24 h (A) e 72 h (B). I risultati sono espressi come percentuale di espressione rispetto all'espressione nelle cellule non stimulate usate come calibratore (100%). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.*

#### 4.4 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI IN LINEE MEGACARIOBLASTICHE STIMOLATE CON PMA E 17 $\beta$ -ESTRADIOLO

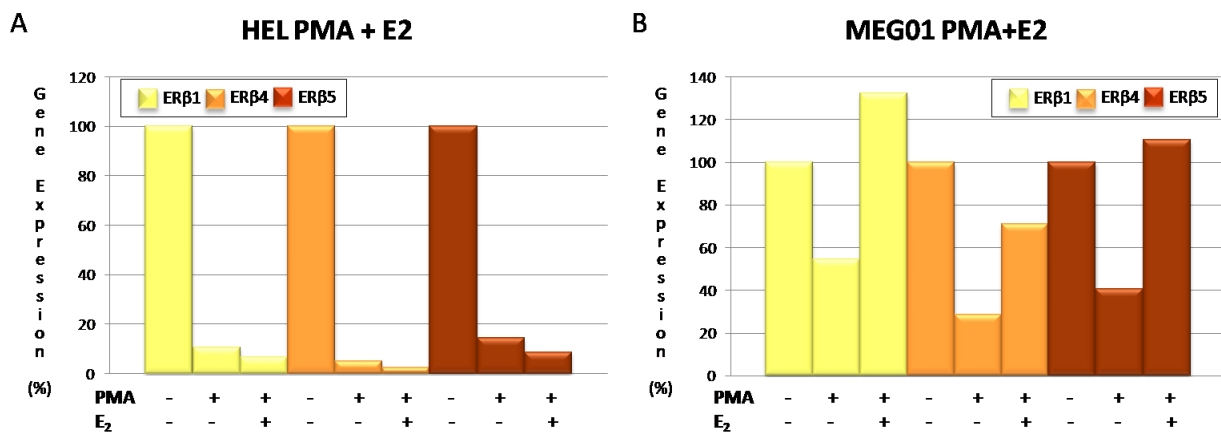
8X10<sup>5</sup> cellule/ml sono state coltivate per 72 ore in terreno RPMI 1640 senza rosso fenolo in presenza od in assenza del PMA 100 nM da solo o in combinazione con il 17 $\beta$ -estradiolo 100 nM. Come controllo sono state usate le cellule non stimulate con aggiunta dello 0,01% di DMSO. Dopo 1 ora dall'inizio dello stimolo è stato aggiunto il 15% di siero inattivato. Successivamente è stato estratto l'RNA totale dalle cellule stimulate e non ed il cDNA derivato da retrotrascrizione è

stato usato in real-time PCR per amplificare i trascritti di ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 4, ER $\beta$ 5, su cui è stata effettuata una quantificazione relativa.

L'espressione dei recettori in esame nelle cellule HEL e MEG01 non stimolate, usate come calibratore, è stata posta arbitrariamente uguale a 100 ed i relativi valori nelle cellule differenziate sono stati espressi come percentuale.

I risultati ottenuti indicano che nelle HEL che hanno ricevuto lo stimolo col solo PMA l'espressione è del 10,6% per ER $\beta$ 1, del 5,1% per ER $\beta$ 4 e del 14,7 per ER $\beta$ 5 rispetto al calibratore. L'espressione delle isoforme in esame diminuisce ancora se le cellule vengono stimolate con il PMA in associazione con il 17 $\beta$ -estradiolo. Infatti l'espressione risulta del 6,7% per ER $\beta$ 1, del 2,6% per ER $\beta$ 4 e del 8,9 per ER $\beta$ 5 rispetto al calibratore (Figura 9A).

Nelle MEG01 stimolate col solo PMA si osserva una minor diminuzione dell'espressione delle isoforme di ER $\beta$ , infatti l'espressione di ER $\beta$ 1 è del 54,4%, di ER $\beta$ 4 è del 28,6% e di ER $\beta$ 5 è di 40,5%. Nelle MEG01 stimolate con PMA 17 $\beta$ -estradiolo in associazione invece ER $\beta$ 1 e ER $\beta$ 5 mostrano aumentati livelli di espressione, 132,3% e 110,4% rispettivamente, mentre l'espressione ER $\beta$ 4 risulta del 70,8%, ovvero aumentata rispetto alle MEG01 stimolate col solo PMA, ma diminuita rispetto al basale (Figura 9B). L'esperimento è stato tuttavia effettuato una sola volta.



**Figura 9:** Real-time PCR

*Espressione delle isoforme di ER $\beta$  nelle cellule HEL (A) e nelle cellule MEG01 (B) stimolate col PMA o col PMA in associazione col 17 $\beta$ -estradiolo. I risultati sono espressi come percentuale di espressione rispetto all'espressione nelle cellule non stimolate usate come calibratore (100%). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.*



#### 4.5 I RECETTORI PER GLI ESTROGENI NEL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOCITARIO

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

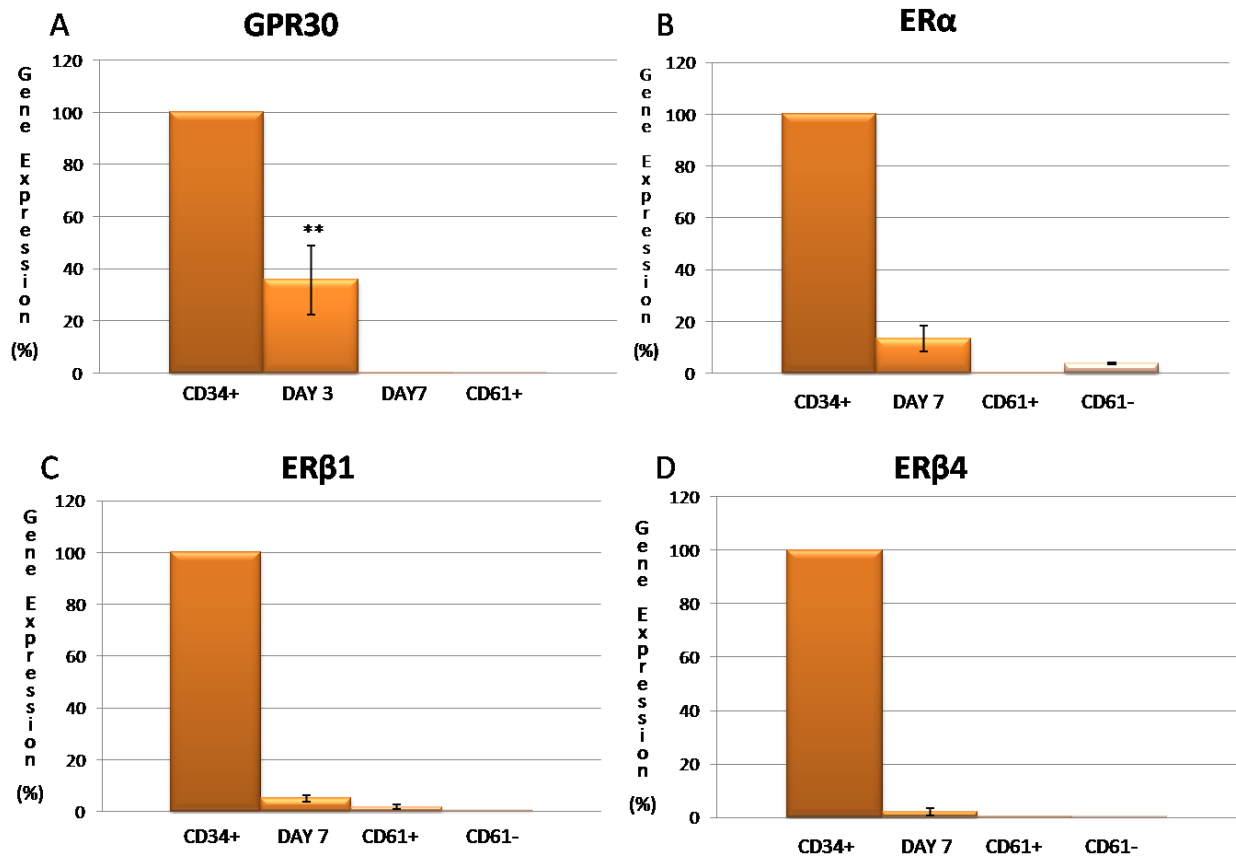
Le cellule staminali CD34 positive sono state estratte dal sangue di cordone ombelicale di donatori sani e le sacche sono state processate entro 72 ore dalla nascita.

In ogni esperimento le cellule staminali derivanti dal sangue di 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 terzo, al settimo giorno ed al tredicesimo giorno di differenziamento, separando le cellule CD61 positive dalle CD61 negative, in quanto il CD61 è altamente espresso nei megacariociti differenziati. 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 ed è stata effettuata 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 del GPR30 al terzo giorno del differenziamento risulta essere del  $35,83\% \pm 13,25$  (\*\* $p < 0,01$ ) e tale recettore non è più rilevabile negli stadi del differenziamento successivi (Figura 10A).

L'espressione di ER $\alpha$  diminuisce è del  $13,4\% \pm 5$  al settimo giorno del differenziamento e non è più rilevabile nei megacariociti terminalmente differenziati (Figura 10B).

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 rispettivamente del  $5,1\% \pm 2,2$  e del  $2\% \pm 2,5$ , per diminuire ancora nei megacariociti terminalmente differenziati ( $1,7 \pm 1,4\%$  per ER $\beta$ 1 e  $0,5\%$  ER $\beta$ 4) (Figura 10C e 10D).



**Figura 10: Real-time PCR**

*Espressione di GPR30 (A), ERα (B), ERβ1 (C) e ERβ4 (D) durante il differenziamento megacariocitario. I risultati sono espressi come percentuale di espressione rispetto all'espressione nelle cellule non stimulate usate come calibratore (100%). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.*

#### 4.6 SNAI1 e SNAI2 NEL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOBLASTICO

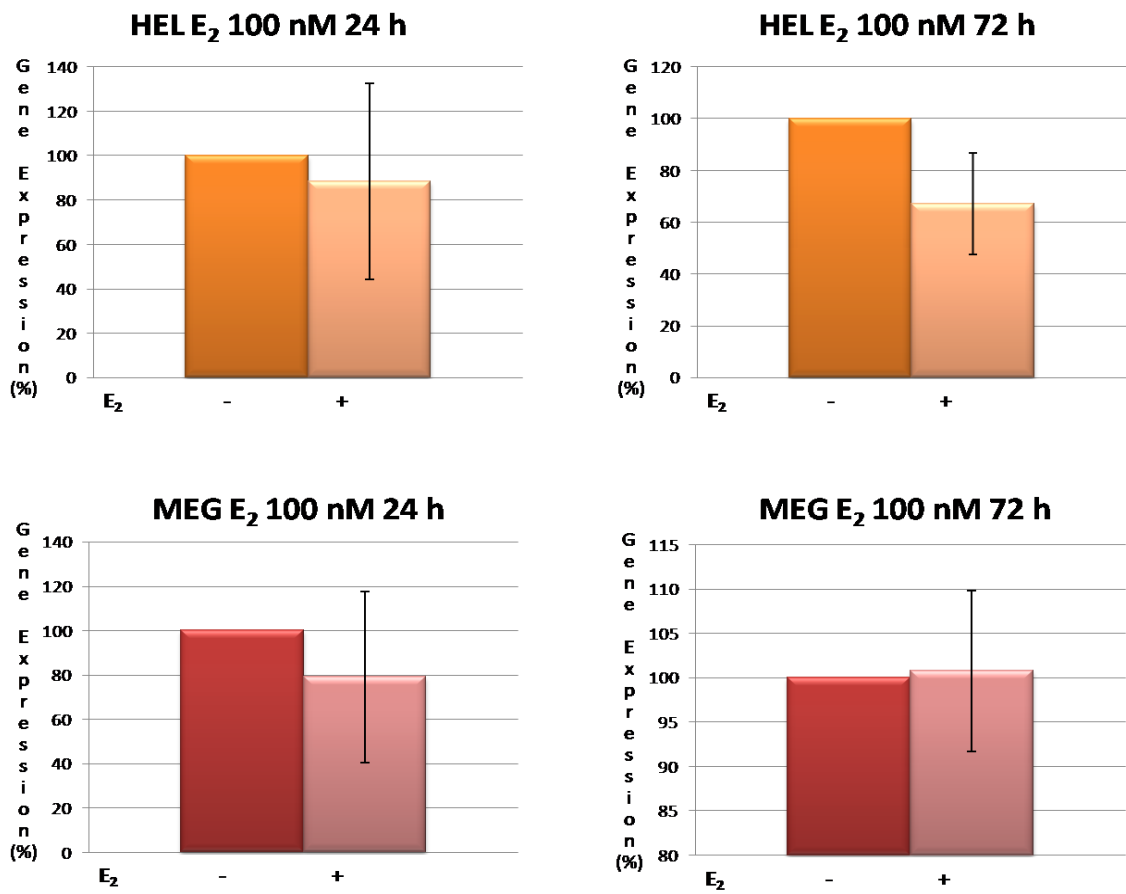
Inizialmente è stata valutata l'espressione di SNAI1 e SNAI2 mediante RT-PCR in cellule HEL stimulate col PMA 100 nM, la TPO 10 ng/ml e l'emina 60 µM come precedentemente descritto. L'espressione dei due fattori trascrizionali è stata valutata in RT-PCR usando primers specifici. L'analisi dei dati è stata effettuata mediante scansione ottica delle bande. Dopo la normalizzazione rispetto alla GAPDH, i risultati ottenuti hanno mostrato un aumento del 170% dell'espressione di SNAI1 dopo lo stimolo con TPO rispetto al non trattato, la cui espressione è stata posta pari a 100. Dopo lo stimolo con PMA l'espressione di SNAI1 è risultata essere del 120% rispetto al non trattato. SNAI2 non sembra invece essere espresso (Figura 11).



**Figura 11:** RT- PCR

*Sono stati amplificati: GAPDH (245 bp), SNAI1 (230 bp) e SNAI2 (246 bp) nelle cellule HeLa (CTRL), controllo positivo per SNAI1 e SNAI2 e nelle cellule HEL non stimulate e stimulate con PMA 100 nM, la TPO 10 ng/ml e l'emina 60 µM.*

Abbiamo quindi deciso di valutare solo l'espressione di SNAI1 nel corso del differenziamento megacarioblastico mediante real-time PCR. Sia le HEL che le MEG01 sono state stimulate come precedentemente descritto con il 17β-estradiolo 100 nM. I risultati ottenuti indicano che nelle HEL trattate per 24 e 72 ore l'espressione di SNAI1 diminuisce rispetto al calibratore, infatti essa risulta essere di 88,5±44,2% e di 67,1%±19,7. Anche nelle MEG01 stimulate con E<sub>2</sub> per 24 ore l'espressione di SNAI1 diminuisce (79,1%±38,6), mentre nelle MEG01 stimulate per 72 ore si ha una pressoché invariata espressione di SNAI1 rispetto al calibratore (100,8%±9). I dati ottenuti tuttavia non risultano essere statisticamente significativi (Figura 12).



**Figura 12:** *Real-time PCR*

*Espressione di SNAI1 nelle cellule HEL (A e B) e MEG01 (B e C) stimulate con 17 $\beta$ -estradiolo per 24 h (A e C) e 72 h (B e D). I risultati sono espressi come percentuale di espressione rispetto all'espressione nelle cellule non stimulate usate come calibratore (100%). Ogni campione è stato analizzato in triplicato.*

## 5. DISCUSSIONE

### 5.1 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI NEL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOBLASTICO

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, siamo andati a indagare l'espressione di ER $\alpha$ , di 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 ematopoietiche estratte dal sangue di cordone ombelicale.

I dati ottenuti mediante real-time PCR in HEL e MEG01 dimostrano che le due linee cellulari hanno un'espressione analoga dei recettori in esame. Infatti ER $\alpha$  e GPR30 sembrano non essere espressi in seguito ai trattamenti utilizzati, fatta eccezione per ER $\alpha$  la quale espressione risulta aumentata nelle MEG01 trattate con la trombopoietina. Sia le HEL che le MEG01 trattate con TPO 10 ng/ml per 72 ore in terreno RPMI con rosso fenolo mostrano un'aumentata espressione di ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 4,

ERβ5, tuttavia le differenze osservate non risultano essere statisticamente significative, a causa dell'elevata variabilità osservata nei diversi esperimenti. Tale variazione potrebbe essere dovuta alla preparazione di trombopoietina utilizzata, che nel tempo può perdere la sua attività.

Un andamento analogo delle isoforme di ERβ analizzate si riscontra nelle due linee cellulari differenziate per 72 ore in presenza di PMA 100 nM in terreno RPMI con rosso fenolo. L'espressione di ERβ1 nelle HEL presenta un elevato grado di variabilità e per tale motivo tale dato non risulta essere statisticamente significativo, mentre nelle MEG01 si ha un leggero e non significativo aumento dell'isoforma. Per quanto riguarda invece ERβ4 e ERβ5 si assiste ad un incremento statisticamente significativo della loro espressione dopo trattamento con PMA in entrambe le linee cellulari. Infatti nelle HEL l'espressione di ERβ4 è triplicata (\*\*p<0,05) e quella di ERβ5 è raddoppiata (\*\*p<0,05). Nelle MEG01 invece l'espressione di entrambe le isoforme è raddoppiata (\*\*p<0,05 per ERβ4 e \*p<0,01 per ERβ5).

Il 17β-estradiolo in entrambe le linee cellulari porta invece ad una diminuzione del 50% dell'espressione delle isoforme di ERβ dopo 24 ore di trattamento in terreno RPMI senza rosso fenolo. Tale condizione rimane pressoché invariata dopo 72 ore di trattamento nelle MEG01, mentre nelle HEL si ha un aumento di circa 1,5 volte di tutte le tre isoforme. Tali esperimenti sono stati al momento condotti solo due volte e per tale motivo non è stato possibile valutare la significatività statistica dei risultati ottenuti.

Successivamente è stato combinato il trattamento con il PMA 100 nM e il 17β-estradiolo 100 nM per 72 ore in terreno RPMI senza rosso fenolo. L'espressione delle diverse isoforme di ERβ è stata valutata confrontando le cellule non trattate con le cellule stimulate col solo PMA o con la combinazione del PMA e dell'E<sub>2</sub>. In entrambe le linee cellulari analizzate si assiste ad una diminuzione dell'espressione delle tre isoforme di ERβ dopo il solo trattamento con PMA, contrariamente a quanto osservato precedentemente. Tale dato potrebbe quindi indicare un potenziale effetto del rosso fenolo sull'espressione dei recettori degli estrogeni. La combinazione tra PMA e 17β-estradiolo inoltre causa una diminuzione ancora più accentuata dell'espressione di ERβ1, ERβ4 e ERβ5 nelle HEL. Nelle MEG01 invece i due composti in sinergia portano ad un aumento dell'espressione dei recettori rispetto al trattamento col solo PMA e per quanto riguarda ERβ1 e ERβ5 si assiste anche ad un aumento della loro espressione rispetto al calibratore.

Nel corso dello studio è stata inoltre valutata la variazione di espressione dei diversi recettori degli estrogeni durante il differenziamento megacariocitario a partire da cellule staminali ematopoietiche. Tali cellule sono state estratte dal sangue di cordone ombelicale ed indotte a

differenziare in presenza trombopoietina, interleuchina 6 ed interleuchina 11. Il differenziamento 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 nei megacariociti maturi 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 inoltre che il suo trascritto è presente nelle cellule staminali, ma che la sua espressione diminuisce notevolmente già al terzo giorno del differenziamento per non essere più rilevabile al settimo giorno del differenziamento e nei megacariociti maturi.

I risultati di real-time PCR suggeriscono inoltre che ER $\alpha$  e GPR30 potrebbero rivestire un ruolo negli stadi precoci del differenziamento megacariocitario, ma non nel megacariocita maturo e nelle piastrine. I dati ottenuti fino ad ora suggeriscono inoltre che l'azione che gli estrogeni hanno sui megacariociti e sulle piastrine possa essere dovuta soprattutto alle isoforme del recettore  $\beta$  degli estrogeni. Studi futuri saranno quindi volti ad indagare l'espressione dei recettori in esame negli stadi precoci del differenziamento. Inoltre l'indagine sarà ampliata anche ad altre isoforme di ER $\beta$  non ancora analizzate, per cercare di chiarire quali isoforme siano maggiormente coinvolte nel differenziamento dei megacariociti e nella segnalazione non genomica delle piastrine.

## 5.2 SNAI1 NEL DIFFERENZIAMENTO MEGACARIOBLASTICO

SNAI1 e SNAI2 sono due fattori trascrizionali membri della famiglia di SNAIL il cui compito principale è quello di reprimere la trascrizione di geni target. Essi intervengono in diversi processi cellulari quali l'EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition), la sopravvivenza cellulare, la divisione cellulare e l'endomitosi. Diversi studi hanno inoltre dimostrato che tali fattori trascrizionali sono in grado di rispondere agli estrogeni. Infatti SNAI1 presenta un elemento di risposta agli estrogeni classico, mentre SNAI2 ne contiene uno parziale (Ye Y et al, 2008). Inoltre ER $\alpha$  sembra essere coinvolto nell'aumento dell'espressione di Snail e Slug (Park SH et al, 2008). Al contrario, ER $\beta$  sembra inibire l'espressione di SNAI1 e SNAI2 (Ding et al, 2006).

Nessuno studio tuttavia ha ancora valutato quale sia il ruolo di SNAI1 e SNAI2 nel differenziamento megacariocitario e come ER $\alpha$  e ER $\beta$  intervengano in queste cellule per controllare la loro espressione. A tale scopo, in questo studio, siamo andati a indagare l'espressione di SNAI1 e SNAI2 nelle HEL e nelle MEG01, linee cellulari megacarioblastiche.

Inizialmente abbiamo valutato l'espressione di entrambi i fattori trascrizionali in RT-PCR sulle cellule HEL stimulate con PMA 100 nM, TPO 10 ng/ml e emina 60  $\mu$ M. I dati ottenuti hanno indicato la presenza solo di SNAI1 in tali cellule e il suo aumento di espressione in seguito a trattamento. La nostra attenzione si è quindi concentrata sull'effetto del 17 $\beta$ -estradiolo 100 nM nella regolazione dell'espressione di SNAI1 in cellule MEG01 e HEL. I dati ottenuti indicano una diminuzione dell'espressione di SNAI1 dopo stimolazione estrogenica per 24 ore in entrambe le linee cellulari analizzate. Dopo 72 ore dall'inizio del trattamento invece solo le HEL presentano una diminuzione dell'espressione di SNAI1, mentre nelle MEG01 la sua espressione risulta pressoché invariata.

Abbiamo inoltre pensato di valutare l'andamento dell'espressione di SNAI1 e la sua localizzazione mediante SDS-PAGE e Western blotting. È noto infatti che SNAI1 sia in grado di traslocare dal nucleo al citoplasma e che la sua localizzazione citoplasmatica, associata alla fosforilazione da parte di GSK-3 $\beta$ , ne inibisca l'attività. Tuttavia, al momento non è stato possibile portare avanti tale indagine a causa di un lotto dell'anticorpo non funzionante, che non riconosceva la proteina neanche nelle cellule usate come controllo positivo.

I dati ottenuti fino ad ora suggeriscono un potenziale ruolo solo di SNAI1 e non di SNAI2 nel differenziamento megacarioblastico. Inoltre dagli studi condotti mediante real-time PCR sembra che l'espressione di SNAI1 diminuisca sotto stimolazione estrogenica. Tale dato è in accordo con



l'ipotesi che ER $\beta$  e le sue isoforme siano i principali attori nella regolazione del differenziamento megacariocitario e che essi siano coinvolti nel modulare l'espressione di SNAI1.

## 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.

Ballester A, Frampton J, Vilaboa N, Calés C. *Heterologous expression of the transcriptional regulator escargot inhibits megakaryocytic endomitosis*. J Biol Chem. 2001; 276(46):43413-8.

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.

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.

Ding JX, Feng YJ, Yao LQ, Yu M, Jin HY, Yin LH. *The reinforcement of invasion in epithelial ovarian cancer cells by 17 beta-Estradiol is associated with up-regulation of Snail*. *Gynecol Oncol*. 2006;103(2):623-30.

Domínguez D, Montserrat-Sentís B, Virgós-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, Puig I, Baulida J, Francí C, García de Herreros A. *Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor*. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(14):5078-89.

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.

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.

Manzanares M, Locascio A, Nieto MA. *The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution.* Trends Genet. 2001; 17(4):178-81.

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.

Nakayama H, Scott IC, Cross JC. *The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor.* Dev Biol. 1998; 199(1):150-63.

Nieto MA. *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3(3):155-66

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.

Park SH, Cheung LW, Wong AS, Leung PC. *Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha*. Mol Endocrinol. 2008;22:2085-98.

Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. J Clin Invest. 2005; 115(12):3348-54.

Pérez-Losada J, Sánchez-Martín M, Pérez-Caro M, Pérez-Mancera PA, Sánchez-García I. *The radioresistance biological function of the SCF/kit signaling pathway is mediated by the zinc-finger transcription factor Slug*. Oncogene. 2003; 22(27):4205-11.

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 GPIIb/IIIa 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.

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.



Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death*. Genes Dev. 2004; 18(10):1131-43.

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

Ye Y, Xiao Y, Wang W, Yearsley K, Gao JX, Barsky SH. *ERalpha suppresses slug expression directly by transcriptional repression*. Biochem J. 2008;416:179-87.

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

## 7. ATTIVITÀ FORMATIVA

### Seminari:

*Production of bio-farmaceuticals in plants*

Prof. Luca Santi

05/12/08

*Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche*

Dott. Antonio Uccelli

12/12/08

*Patologia della radice aortica: dalla clinica alla biologia molecolare*

Prof. Giuseppe Faggian

18/12/08

*La malattia celiaca*

Dott. Riccardo Troncone

09/01/09

*Porpora trombocitopenica autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici*

Dott. Francesco Zaja

13/01/09

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

Dott. Marco Salvetti

27/01/09

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

Prof. Antonio Musarò

12/02/09

*Ruolo dei polimorfismi dei geni della pigmentazione nell'induzione di mutazioni somatiche nei melanomi*

Prof.ssa G. Bianchi Scarra'

12/02/09

*When a fine tuner of signaling pathways becomes a dangerous amplifier: the case of the Prolyl-isomerase Pin1 in cancer*

Prof. G. Del Sal

20/02/09

*Linee guida per il riscontro diagnostico sulla morte improvvisa*

Prof. Gaetano Thiene

25/02/09

*La proteomica: un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine*

Prof. Piero Pucci

18/03/09

*Cellule staminali tumorali: implicazioni terapeutiche*

Prof. Giorgio Stassi

18/03/09

*Le nanotecnologie applicate alla medicina*

Prof. G. Peluso

19/03/09

*Regulation of integrin functions in vascular systems*

Prof. F. Bussolino

26/03/09

*Enzima P e il Social Network per l'Innovazione*

Dott. Salvatore Timpanaro

28/03/09

*I bioreattori nella Medicina Rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up*

Dott.ssa S. Mantero

9/04/09

*Patologia dei tumori cerebrali. Recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi*

Dott. Davide Schiffer

22/04/09

*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

28/04/09

*Polarized inflammation in tumor development*

Prof. Antonio Sica

30/04/09

*Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo*

Prof. Amedeo Columbano

05/06/09

*Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana*

Prof. Giuseppe Poli

12/05/09

*Neurotossicità delle proteine 'misfolded' nelle malattie del motoneurone*

Prof. Angelo Poletti

12/05/09

*The molecular bases of chromosome segregation*

Dr. Andrea Musacchio

14/05/08

*Il Doping ormonale: aspetti clinici e legislativi*

Prof. L. Di Luigi

21/05/09

*Role of Raf in tumorigenesis*

Prof. M. Baccharini

03/06/09

*Marcatori molecolari nel carcinoma coloretale: dalla teoria alla pratica clinica*

M. Frattini

10/06/09

*I Lupus Eritematoso Cutaneo: quadro clinico ed immunopatologico*

Prof. E. Berti

06/07/09

*Targeting met in cancer and metastasis: a matter of addiction and sensitivity*

Prof.ssa S. Giordano (Università di Torino e IRCC Candiolo)

9/07/09

## **SEMINARI ESTERNI**

*Cellule staminali mesenchimali in clinica umana e veterinaria*

Giornata di Studio e aggiornamento

Brescia, 16 Ottobre 2008

*La medicina riparativa e le biotecnologie: attualità, prospettive e normative*

Pavia, 18 Settembre 2009

# ***SEZIONE 2***

## CONGRESSI FREQUENTATI

### ANNO 2007-2008

CNBX, Perugia 17-19 settembre 2008

### ANNO 2008-2009

22<sup>a</sup> Riunione nazionale "A. Castellani" dei dottorandi di ricerca in discipline biochimiche. Brallo di Pregola, 9-12 giugno 2009.

54<sup>th</sup> National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB), Catania 23-27 Settembre 2009

## COMUNICAZIONI A CONGRESSI

### ANNO 2007-2008

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

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

*(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

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

9ª 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

9ª 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

## **ANNO 2008-2009**

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

54<sup>th</sup> National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB), Catania 23-27 Settembre 2009

*"ANALYSIS OF EXPRESSION OF CLASSICAL ESTROGEN RECEPTORS AND GPR30 DURING MEGAKARYOBLASTIC DIFFERENTIATION"*

**C. Di Vito**, S. Bergante, A. Rastoldo, A. Bagarotti, A. Bertoni, F. Sinigaglia  
(poster)

### *B) Altre comunicazioni*

9ª 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

9a 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

Platelets 2008: 5<sup>th</sup> International Symposium, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA  
15-18 ottobre 2008

*“ESTROGEN AND ITS PRECURSOR DEHYDROEPIANDROSTERONE DIRECTLY AFFECT PLATELET FUNCTION WITH OPPOSITE EFFECTS”*

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

Platelets 2008: 5<sup>th</sup> International Symposium, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA  
15-18 ottobre 2008

*“THE ENDOCANNABINOID 2-ARACHIDONOYLGLYCEROL ACTIVATES HUMAN PLATELETS THROUGH NON-CB1/CB2 RECEPTORS”*

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

21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology,  
Shanghai 2-7 Agosto 2009

*“INHIBITION OF THROMBIN INDUCED PLATELET AGGREGATION BY DEHYDROEPIANDROSTERONE-SULFATE”*

A. Rastoldo, C. Sarasso, A. Bagarotti, **C. Di Vito**, A. Bertoni, F. Sinigaglia