

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare *Ciclo XXIII*

Relazione 3° anno

TITOLO

**Il ruolo degli endocannabinoidi
nella sintesi e funzionalità dei trombociti**

Candidato: Bagarotti Alessandra

Tutor: Professoressa Fabiola Sinigaglia

SEZIONE 1	3
------------------------	----------

GLI ENDOCANNABINOIDI E LA MEGACARIOCITOPOIESI

RIASSUNTO.....	4
-----------------------	----------

INTRODUZIONE.....	5
--------------------------	----------

SCOPO DEL LAVORO	18
-------------------------------	-----------

METODI.....	20
--------------------	-----------

RISULTATI.....	24
-----------------------	-----------

DISCUSSIONE	35
--------------------------	-----------

GLI ENDOCANNABINOIDI E LA FUNZIONALITA' PIASTRINICA

SCOPO DEL LAVORO	41
-------------------------------	-----------

METODI.....	42
--------------------	-----------

RISULTATI.....	45
-----------------------	-----------

DISCUSSIONE	60
--------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA.....	62
--------------------------	-----------

SEZIONE 2	72
------------------------	-----------

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

RIASSUNTO

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

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

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

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

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

In letteratura sono inoltre riportati dati (in parte pubblicati dal nostro laboratorio *Baldassarri et al., 2008*) che suggeriscono un ruolo dei cannabinoidi endogeni nel controllo e modulazione della funzionalità piastrinica. Una parte dei miei esperimenti è quindi finalizzata allo studio dettagliato del meccanismo d'azione con cui gli endocannabinoidi (ed in particolare il 2-arachidonoilglicerolo) inducono aggregazione piastrinica.

INTRODUZIONE

LA MEGACARIOCITOPOIESI

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

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

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

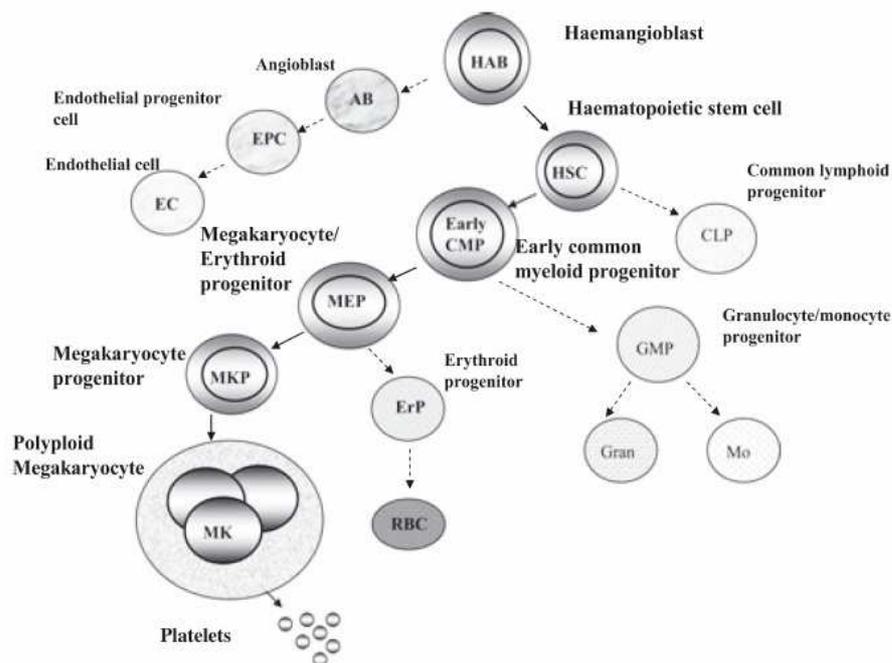


FIG.1 SCHEMA DEL DIFFERENZIAMENTO EMATOPOIETICO: Lo sviluppo delle cellule del sangue procede da una cellula staminale ematopoietica (HSC), che può replicarsi o differenziare in cellule progenitrici di varie filiere: un progenitore linfocitario comune (CLP) o un progenitore mieloide comune (CMP). Queste cellule poi originano progenitori più differenziati, compresi quelli indirizzati alle filiere dei megacariociti e cellule eritroidi (MEPs). 5

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

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

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

REGOLAZIONE DELLA MEGACARIOCITOPOIESI

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

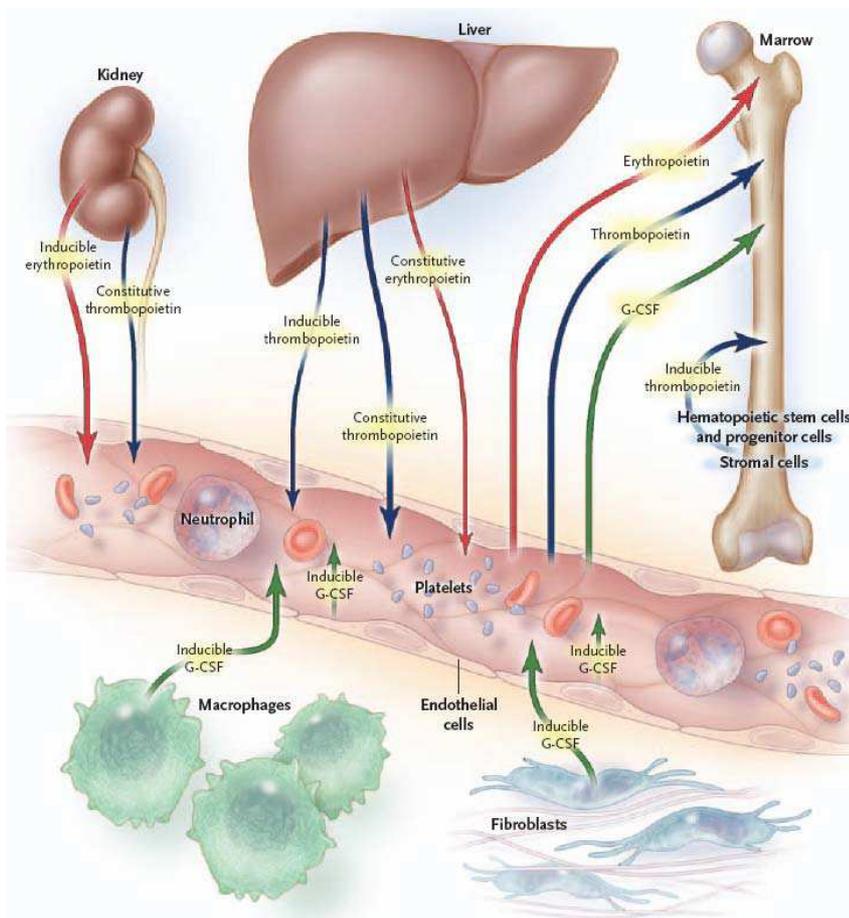


FIG. 2 PRODUZIONE DEI FATTORI DI CRESCITA EMATOPOIETICI: la produzione di fattori di crescita dai vari tessuti e cellule (freccie) è sia costitutiva che inducibile ed è soggetta al consumo periferico. Il G-CSF (freccie verdi) è soprattutto inducibile in tessuti dai fibroblasti e macrofagi e da cellule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

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

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

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

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

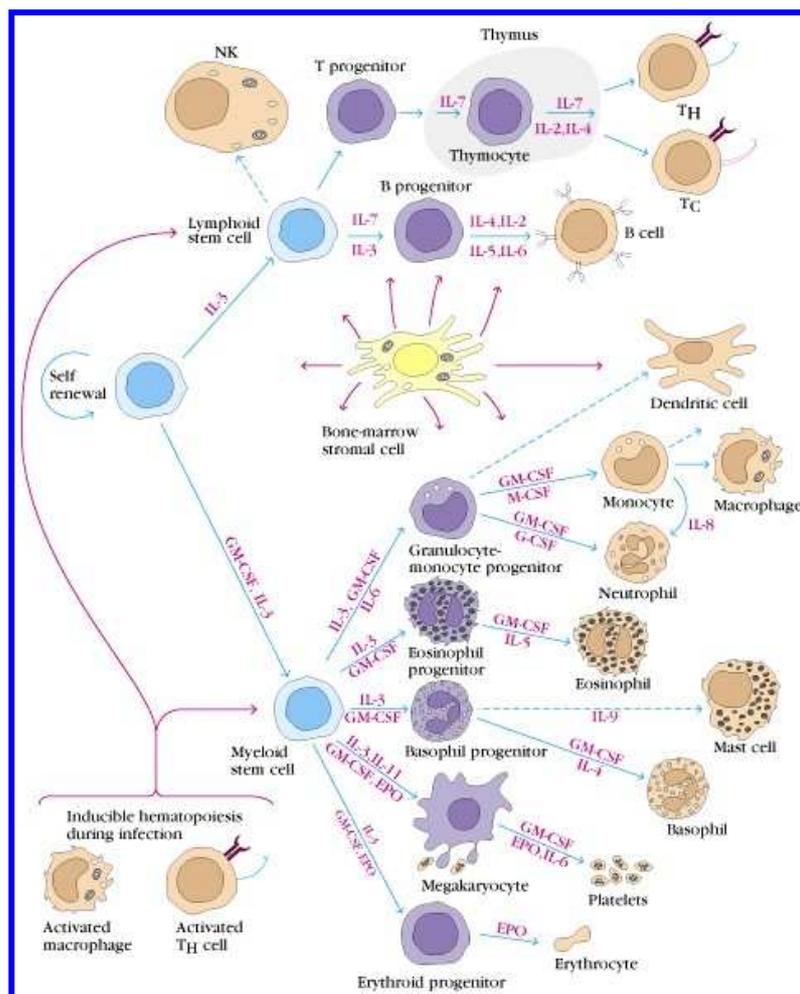


FIG. 3 FATTORI COINVOLTI NEL DIFFERENZIAMENTO EMATOPOIETICO: Lo sviluppo di differenti tipi cellulari a partire dalla cellula staminale mieloide, richiede l'azione combinata di più citochine e fattori di crescita. La produzione di piastrine, in particolare, è regolata da trombopoietina (TPO), eritropoietina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

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

PRODUZIONE E RILASCIO DELLE PIASTRINE

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

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

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

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

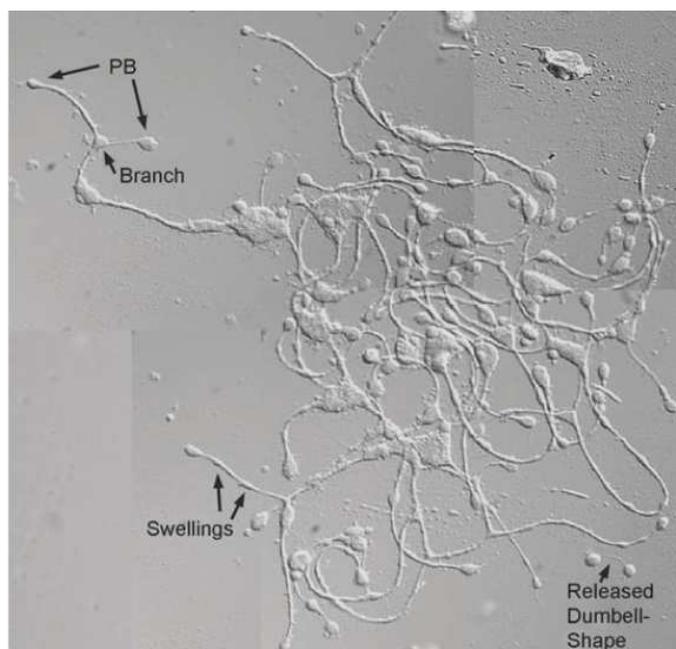
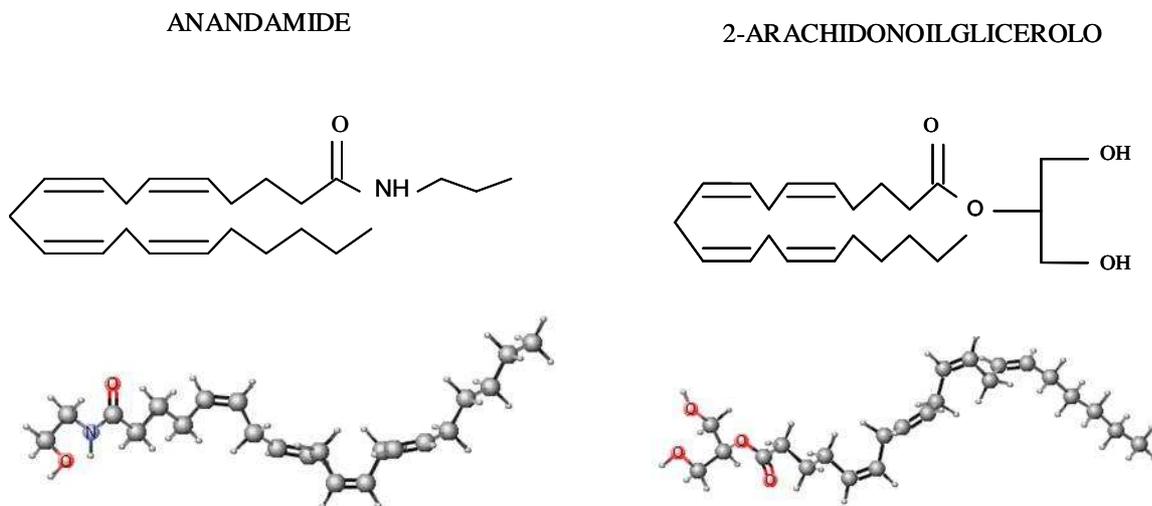


FIG. 4 FORMAZIONE DI PROPIASTRINE: nell'arco di poche ore, il citoplasma del megacariocita viene convertito in protrusioni filamentari chiamate propiastrine. Dall'immagine è possibile osservare lungo le estroflessioni la presenza di rigonfiamenti (che conferiscono alla propiastrina l'aspetto di una collana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

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

GLI ENDOCANNABINOIDI

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



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

GLI ENDOCANNABINOIDI: sintesi e degradazione

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

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

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

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

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

- a) ricaptazione da parte delle cellule che, nel caso dell'anandamide, viene facilitata dal trasportatore di membrana AMT;
- b) riesterificazione dei prodotti dell'idrolisi in fosfolipidi di membrana;
- c) idrolisi enzimatica (Di Marzo *et al.*, 1994; Di Marzo *et al.*, 1996; Cravatt *et al.*, 1996).

In particolare l'idrolisi dell'anandamide (in acido arachidonico ed etanolamina) è catalizzata da un enzima che è stato caratterizzato e denominato "idrolasi dell'amide degli acidi grassi" (FAAH), una serina-idrolasi di membrana contenente una sequenza ricca in prolina riconosciuta da molecole contenenti il dominio SH3 (Src homology 3) (Goparaju *et al.*, 1998). In alcune condizioni FAAH catalizza anche l'idrolisi del 2-AG (Cravatte *et al.*, 1996), per il quale, comunque, esistono anche altre idrolasi più selettive (MAGL). Più recentemente è stato scoperto che, oltre a questo meccanismo, l'AEA può essere metabolizzata anche dalla ciclossigenasi-2 (COX-2), dalla lipossigenasi (LOX) e dal citocromo P450 (Basavarajappa, 2007)

Nel caso del 2-AG invece, non è ancora stato chiarito il meccanismo di "re-uptake". Diverse sono le ipotesi da confermare: passaggio della membrana cellulare per diffusione semplice, attraverso il trasportatore dell'anandamide (AMT) o per mezzo di uno specifico trasportatore per il 2-AG (Hermann *et al.*, 2006).

Entrato nella cellula il 2-AG può essere idrolizzato da diversi enzimi: la monoacilglicerolo lipasi (MAGL), l'idrolasi delle amidi degli acidi grassi (FAAH), la ciclossigenasi-2 (COX-2) e le idrolasi contenenti dominio α/β 6 e 12 (ABHD6, ABHD12) (Straiker *et al.*, 2009).

Tra questi enzimi quello che contribuisce maggiormente al metabolismo del 2-AG, a livello del sistema nervoso, è la serina idrolasi MAGL in grado di scindere il 2-arachidonoil-glicerolo in acido arachidonico (AA) e glicerolo (Long *et al.*, 2009).

MAGL è presente sia nelle membrane che nelle frazioni citosoliche.

GLI ENDOCANNABINOIDI: i recettori

I due principali tipi di recettori dei cannabinoidi, CB1 e CB2, appartengono alla super famiglia di recettori associati a proteine-G (G Protein-coupled Receptors o GPCRs), e come tali presentano un segmento N-terminale nella matrice extracellulare, sette domini ad alfa elica trans-membrana, tre "anse" extracellulari e tre citosoliche contenenti anche la porzione C-terminale. Il sito di legame è localizzato nelle porzioni transmembrana (Xie *et al.*, 2003).

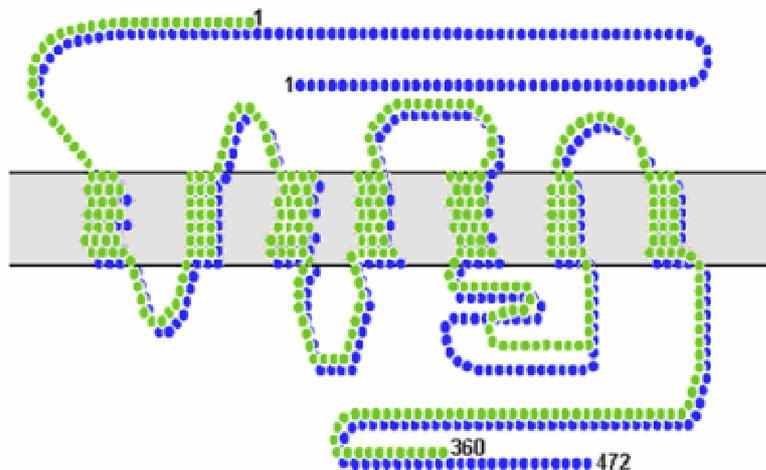


FIG. 5 Struttura dei recettori CB1 (blu) e CB2 (verde)

CB1 e CB2 sono in particolare associati a proteine di tipo Gi che mediano diversi effetti intracellulari tra cui: l'inibizione della adenilato ciclasi, l'attivazione di proteine chinasi e, il solo CB1, la regolazione dei canali di calcio e potassio (Howlett, 2002).

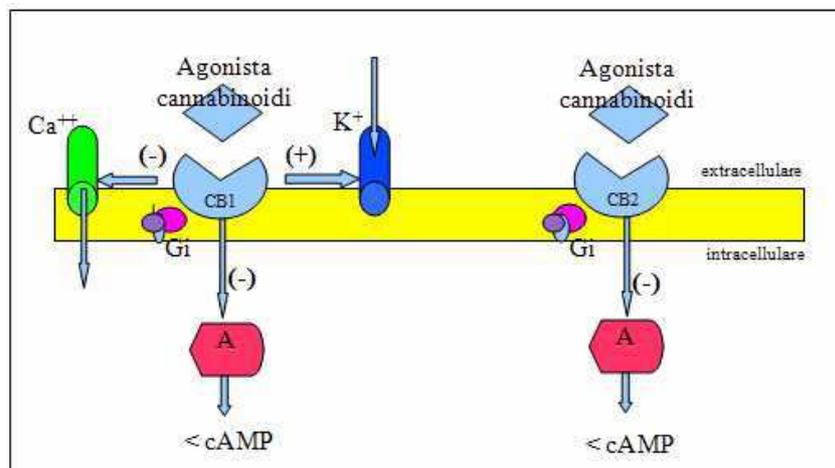


FIG. 6 Vie di trasduzione del segnale attivate dagli agonisti dei cannabinoidi

L'anandamide lega sia il CB1 che il CB2, comportandosi da agonista parziale con i recettori CB1 e mostrando una minore affinità per i CB2. Tramite modifiche strutturali sono stati derivati degli analoghi ad azione selettiva sul recettore CB1 come la metanandamide, l'arachidonil-2-cloretilamide (ACEA) e l'arachidonilciclopropilamide (ACPA) (*Pertwee et al., 2002*). Il 2-AG, che agisce invece come agonista totale dei recettori CB, condivide con l'AEA la localizzazione nelle porzioni transmembrana del sito di legame (*Xie et al., 2003*).

CB1, primo recettore dei cannabinoidi ad essere stato clonato, è localizzato principalmente nei neuroni centrali, in quelli periferici e nelle cellule gliali, è espresso anche nel sistema riproduttivo (sia maschile che femminile) e nella microcircolazione (*Mukhopadhyay et al., 2002*).

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

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

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

diversa percezione del dolore (*Di Marzo et al., 2002*). Studi recenti hanno dimostrato che anche l'endocannabinoide N-arachidonoildopamina è un potente attivatore di questo recettore, mentre il 2-arachidonoil-glicerolo lo attiva solo debolmente (*Sugiura et al., 1995*). Un altro recettore candidato come possibile target degli endocannabinoidi è il recettore orfano, a sette domini transmembrana accoppiato a proteine G, GPR55. Quest'ultimo è localizzato sia a livello del sistema nervoso centrale che in molti tessuti periferici e mostra una bassa omologia di sequenza con CB1 e CB2. Diversamente da questi ultimi, sembra che GPR55 possa essere accoppiato a $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{12}$ o $G\alpha_q$ (*Godlewski et al., 2009*).

Infine un ultimo possibile recettore per endocannabinoidi è il recettore GPR119: è espresso prevalentemente nel pancreas e nel tratto gastrointestinale e sembra essere accoppiato a $G\alpha_s$ (*Godlewski et al., 2009*).

SCOPO DEL LAVORO

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

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

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

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

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

E' in questo contesto che si inserisce il mio lavoro, nato con l'intento di valutare la presenza dei recettori cannabici sui precursori megacariocitari, studiare l'eventuale modulazione della loro espressione durante la megacariocitopoiesi, ed infine chiarire l'eventuale ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento megacariocitario.

METODI

Isolamento di cellule staminali ematopoietiche murine

Cellule del midollo osseo sono state prelevate dalle tibie e dai femori di topi Balb/C di 6-8 settimane e raccolte in PBS contenente 2% BSA, 0.38% trisodio citrato e 1 U/ml di DNAsi. Le cellule mononucleate sono state isolate tramite centrifugazione in gradiente di Ficoll Hypaque (1.084 g/ml, GE Healthalcare) per 30min a 400xg. Le cellule così ottenute sono poi state coltivate ad una densità iniziale di 10^6 /mL in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) in presenza di 10 ng/mL di Trombopoietina, 10 ng/mL di Interleuchina-6 e 10 ng/mL di Interleuchina-11, murine (PeproTech).

Le cellule utilizzate al giorno 0 del differenziamento vengono lasciate aderire per due ore alla plastica e poi centrifugate per 10 minuti a 400xg. Le cellule lasciate a differenziare per tre giorni vengono invece centrifugate per 10 minuti a 300xg. Dopo 5 giorni di coltura la popolazione di megacariociti maturi e poliploidi è stata arricchita sedimentando le cellule per gravità per 1 ora, a 37° C, in provette coniche e poi applicandole su un gradiente discontinuo di 1% -2% - 3% BSA in PBS, pH 7.4 e lasciandole nuovamente sedimentare per gravità (30 minuti a 37° C).

Preparazione di piastrine murine

Il sangue viene prelevato da topi sani Balb/C di 6-8 settimane. Come anticoagulante vengono utilizzati pochi μ L di una soluzione 1:2 di 3.8% Sodio citrato e ACD (130 mM acido citrico, 152 mM Na-citrato e 112 mM D-glucosio). Il volume di sangue aspirato mediante puntura cardiaca, viene portato a circa 1.8 mL (aggiungendo tampone Tyrode - 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃; pH 7.4). Il plasma ricco di piastrine (PRP) è il surnatante ottenuto da una centrifuga a 179xg, per 6 minuti, a 30° C. Per aumentare il numero di piastrine disponibili, il pellet di globuli rossi viene risospeso in Tyrode e nuovamente centrifugato. Il plasma ricco in piastrine raccolto viene addizionato di 0,02 U/mL di apirasi e 1 μ M PGE1; segue una centrifuga a 550xg, per 5 minuti, a 30° C. Il surnatante ottenuto (plasma povero in piastrine) viene allontanato dal

pellet piastrinico che dev'essere invece risospeso in Tyrode. Le cellule vengono contate in camera di Burker e portate alla concentrazione desiderata (tamponare Tyrode).

Preparazione di lisati cellulari totali e analisi proteica

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

Analisi dell'espressione genica di TRPV-1 mediante real time -PCR

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

l'espressione del recettore nelle cellule del giorno 0 del differenziamento (valore arbitrariamente posto uguale a 1).

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare

Al fine di investigare un possibile ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento della linea megacariocitica, cellule staminali ematopoietiche murine sono state isolate come precedentemente descritto e messe a differenziare in presenza di 10 μ M R-1 metanandamide (un analogo sintetico dell'anandamide ma più stabile) sola o aggiunta di 1 μ M AM251 (inibitore selettivo di CB1) (entrambe Cayman Chemical). Le cellule sono state differenziate nel terreno e poi raccolte ai diversi giorni del differenziamento come descritto nel primo paragrafo della sezione "metodi".

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: cytospin

Campioni di cellule preparate e raccolte come precedentemente descritto sono state raccolte al quinto giorno del differenziamento. Circa 15000 cellule sono state risospese in 100 μ L PBS+1% BSA e cytocentrifugate a 400 rpm, 5 minuti, accelerazione massima (Cytocentrifuga Shandon 3). Lo spot così ottenuto è quindi stato colorato con DIFF QUICK Staining Set (Medion Diagnostic), seguendo le istruzioni della ditta produttrice. In sintesi: le cellule precedentemente spottate su vetrino vengono immerse ripetutamente nelle soluzioni di fissativo e colorante al fine di visualizzarne le caratteristiche istologiche. I vetrini con cellule fissate e colorate sono stati fotografate con microscopio Leica EC3 collegato a fotocamera digitale.

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: poliploidizzazione – citofluorimetria a flusso

Cellule raccolte al giorno 0 sono state differenziate in presenza di 10 μ M MetAEA sola o aggiunta di 1 μ M Am251 (antagonista selettivo di CB1 – recettore preferenziale

dell'AEA per la sua attività biologica) e differenziate. I campioni raccolti e pellettati ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento come precedentemente descritto sono stati delicatamente risospesi in 130 μ L di PBS e poi aggiunti goccia a goccia di 1170 μ L di Et-OH 70% freddo. Le cellule sono quindi state centrifugate 10', 123xg, temperatura ambiente (ad esclusione di quelle raccolte al quinto giorno che sono state sedimentate) e successivamente lavate in PBS. I campioni sono infine stati lentamente risospesi e poi incubati 30' al buio, in una soluzione contenente 50 μ g/mL di propidio ioduro ed RNasi (0,2 mg/mL). Il materiale così preparato è stato acquisito con citofluorimetro FACScan ed analizzato con il software CellQuest (Becton Dickinson).

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: aumento delle dimensioni cellulari

Cellule staminali ematopoietiche murine sono state isolate e piastrate ad una densità iniziale di 10^6 cellule/mL in terreno IMDM arricchito (come precedentemente descritto) e aggiunto, dove necessario, di 10 μ M R-1 metanandamide sola o in presenza di 1 μ M AM251.

Dal momento che, come precedentemente descritto, la dimensione cellulare può in questo caso essere considerata indice di differenziamento, cellule opportunamente trattate e differenziate, sono state fotografate con fotocamera digitale collegata al microscopio (AXIOVERT 40 CFL), ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento.

Negli esperimenti di citofluorimetria a flusso, eseguiti per avere dati più quantitativi, i campioni raccolti e pellettati ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento sono stati delicatamente risospesi ed incubati al buio per 30 minuti, in 10 mg/ml di anticorpo anti-CD41 marcato FITC o rispettivo controllo isotipico (Becton Dickinson). Le cellule pellettate e lavate in PBS sono state quindi risospese in una soluzione di PBS aggiunto di propidio ioduro 1 μ g/mL.

I campioni sono stati infine acquisiti con citofluorimetro FACScan ed analizzati con il software CellQuest (Becton Dickinson).

RISULTATI

Espressione di TRPV-1: analisi mediante Immunoblotting

La presenza dei recettori degli endocannabinoidi CB1 e CB2 era stata valutata lo scorso anno; lo studio mancava però dell'analisi dell'espressione del TRPV-1. Cellule staminali ematopoietiche murine sono state isolate come precedentemente descritto, e indotte al differenziamento megacariocitico. I lisati proteici sono stati preparati ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento. L'immunocolorazione è stata eseguita con specifico anticorpo commerciale anti-TRPV1 (Santa Cruz). Com'è possibile osservare in figura 1A il TRPV-1 è presente in modo apprezzabile solamente nell'ultimo stadio differenziativo considerato. L'espressione di TRPV-1 è stata valutata e confermata anche in piastrine murine (pannello B).

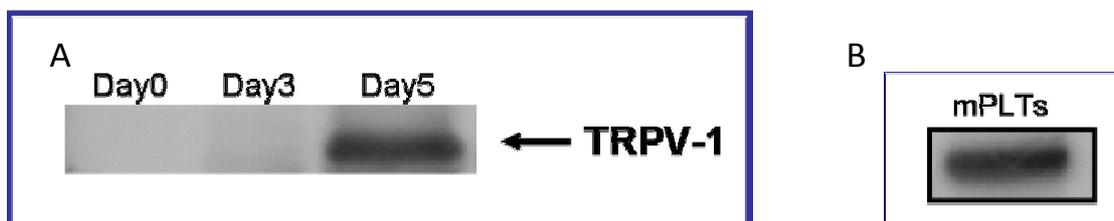


FIG. 1 ESPRESSIONE DEI RECETTORE TRPV-1 IN MEGACARIOCITI E PIASTRINE MURINE: in figura è riportata l'espressione di TRPV-1 durante diversi stadi del differenziamento megacariocitico murino (A): il TRPV-1 è presente in modo apprezzabile solamente nell'ultimo stadio differenziativo considerato (quinto giorno del differenziamento) e in piastrine murine (B).

Real Time -PCR

Variazioni di espressione genica di CB1 e CB2 erano state analizzate nelle diverse fasi del differenziamento megacariocitico mediante analisi di realtime-PCR semi-quantitativa lo scorso anno. Anche in questo caso ho ritenuto di estendere gli studi al TRPV-1.

Cellule staminali ematopoietiche murine sono state raccolte da midollo osseo ed indotte al differenziamento. L'RNA estratto è stato opportunamente quantificato, retrotrascritto ed amplificato mediante real-time PCR semi-quantitativa. La presenza dei trascritti è stata analizzata al giorno 0 (raccolta cellule ed induzione al differenziamento), al giorno 3, e al giorno 5. La presenza dei trascritti è stata valutata nelle cellule non differenziate in base ai valori dei rispettivi ΔCt (ciclo soglia del trascritto in analisi meno ciclo soglia del controllo endogeno GAPDH). I dati sono stati analizzati ponendo i livelli di espressione nelle cellule non differenziate uguali a 1, ed esprimendo con valori relativi i livelli di espressione nelle cellule differenziate. Com'è possibile osservare in figura 2, l'mRNA di TRPV-1 aumenta nel corso del differenziamento, soprattutto nell'ultima fase (dal giorno 3 al giorno 5).

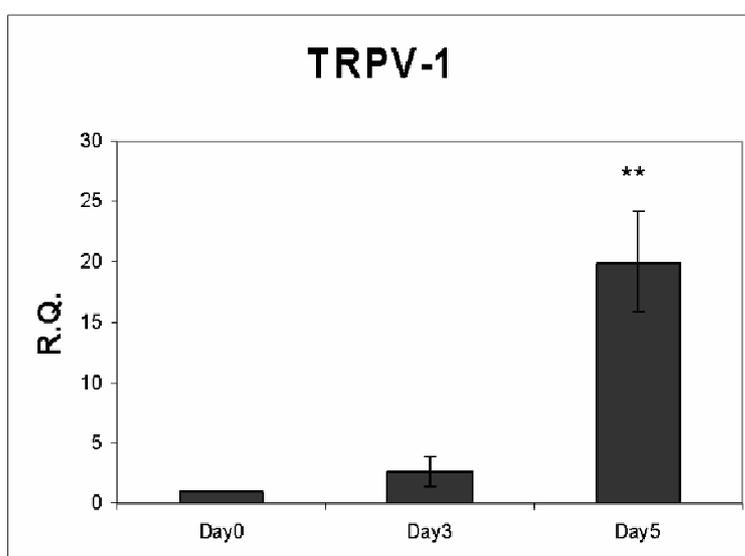


FIG. 2 ANALISI IN REAL-TIME PCR – TRPV-1: la presenza di trascritto del recettori vanilloide di tipo 1 è stata analizzata mediante real-time PCR semi-quantitativa. Controllo endogeno utilizzato: GAPDH (gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi). L'analisi statistica è stata condotta utilizzando test t-Student (* p <

0,05; ** $p < 0,01$). Il grafico rappresenta la media di tre esperimenti indipendenti; le barre di errore mostrano l'errore standard della media.

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare

In questa sezione descriverò i preliminari esperimenti che ho condotto per valutare un possibile ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche murine verso la linea megacariocitaria. Come indici di avvenuto differenziamento ho considerato tre principali parametri: il grado di poliploidizzazione del nucleo, l'aumento delle dimensioni cellulari e l'espressione di marker cellulo-specifici.

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: poliploidizzazione - cytospin

Per avere un'iniziale informazione sul grado di poliploidizzazione nucleare, cellule opportunamente trattate e differenziate sono state raccolte ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento come precedentemente descritto. I campioni sono stati cytospinnati e colorati con colorazione Diff-Quik secondo le istruzioni della ditta produttrice. Come atteso all'aumentare del differenziamento, aumentava anche il grado di poliploidizzazione nucleare (presenza di un nucleo polilobato, di colore violaceo).

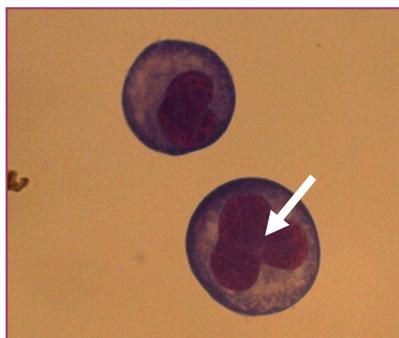


FIG. 3 ANALISI DELLA POLIPLOIDIZZAZIONE NUCLEARE MEDIANTE COLORAZIONE EMATOLOGICA: la figura, rappresentativa delle altre ottenute, mostra un megacariocita murino al quinto giorno del differenziamento. La colorazione evidenzia la presenza di un ampio nucleo polilobato (freccia bianca).

I dati ottenuti da questo primo tipo di esperimento, che consideravamo comunque preliminare, hanno mostrato l'effettiva presenza di un nucleo grande e polilobato durante il differenziamento.

Per ottenere dati più quantitativi, che potessero evidenziare differenze di poliploidizzazione nei campioni trattati con endocannabinoidi, abbiamo eseguito ulteriori esperimenti in citofluorimetria a flusso.

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: poliploidizzazione – citofluorimetria a flusso

Per valutare se gli endocannabinoidi fossero in grado di influire sul grado di poliploidizzazione megacariocitaria, le cellule raccolte al giorno 0 sono state trattate con 10 μ M MetAEA sola o in presenza di 10 μ M Am251 (antagonista selettivo di CB1 – recettore preferenziale dell'AEA per la sua attività biologica) e differenziate. I campioni raccolti ai giorni 0 (due ore dopo il trattamento), 3 e 5 del differenziamento sono stati colorati 30' con propidio ioduro (vedi sezione materiali e metodi), per valutarne il contenuto di DNA. I risultati riportati in figura 4 mostrano che il trattamento con cannabinoidi non modula il grado di poliploidizzazione nel nostro sistema cellulare.

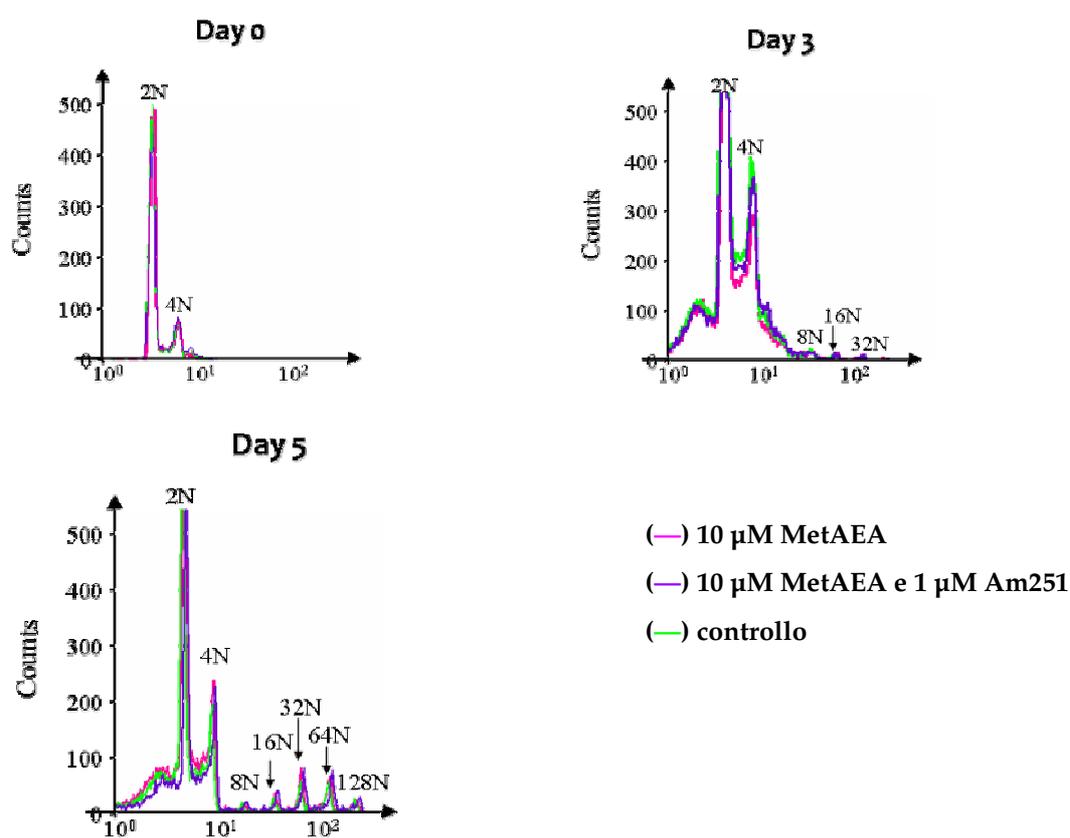


FIG. 4 ANALISI DELLA POLIPLOIDIZZAZIONE NUCLEARE MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO. La figura, rappresentativa delle altre ottenute in tre diversi esperimenti indipendenti, mostra il grado di poliploidizzazione dei megacariociti (numero dei picchi), durante i diversi giorni del differenziamento. Come atteso c'è un progressivo aumento del numero dei picchi (cellule poliploidi) nel

tempo. I profili dei vari trattamenti risultano essere pressoché sovrapponibili nei diversi giorni considerati. La metanandamide non influisce quindi sul grado di poliploidizzazione cellulare del nostro sistema.

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: aumento delle dimensioni cellulari

Un altro evento chiave che accompagna e caratterizza la megacariocitopoiesi è, oltre all'aumento di poliploidizzazione nucleare, anche l'ingrossamento del citoplasma; in questo particolare sistema quindi le cellule "grandi" sono da considerarsi differenziate. La figura 5 mostra un'immagine acquisita al microscopio, di cellule al giorno 0, 3 e 5 del differenziamento (rappresentative delle altre immagini realizzate). Com'è possibile osservare al giorno 0 le cellule sono molto piccole e con dimensioni pressoché uniformi, ai giorni 3 e 5 del differenziamento invece, sono presenti cellule che hanno diametro considerabilmente aumentato (che possiamo quindi ritenere differenziate).

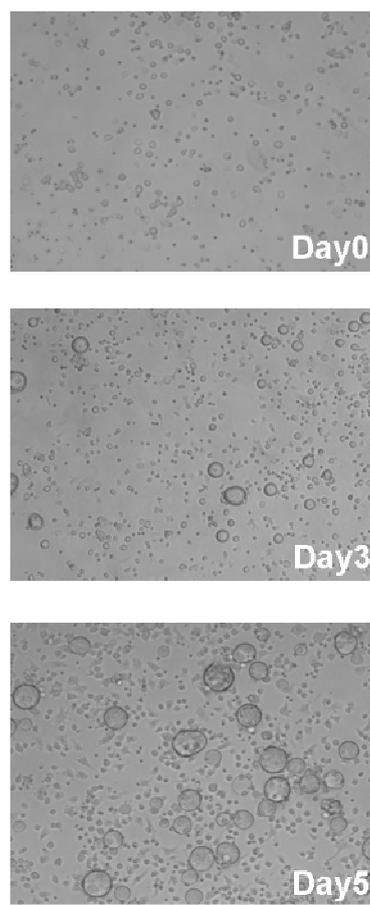
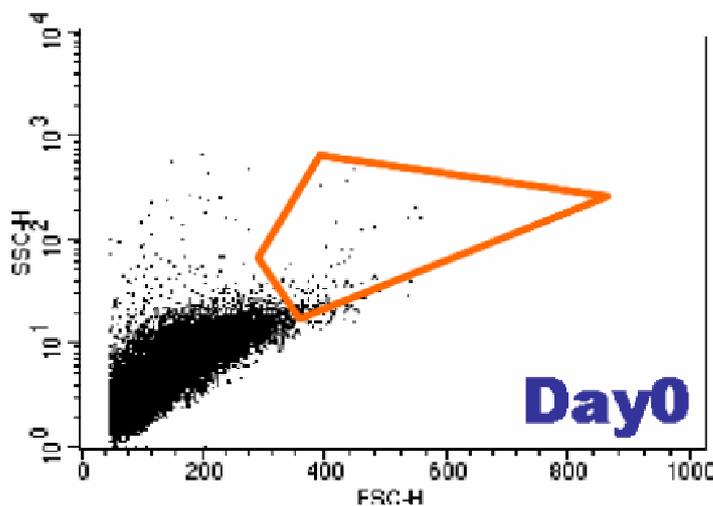


FIG. 5 AUMENTO DI DIMENSIONI CELLULARI DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO: le immagini (rappresentative delle altre foto realizzate) sono state acquisite con fotocamera digitale collegata al

microscopio (AXIOVERT 40 CFL), ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento. L'aumento delle dimensioni è, in questo particolare sistema cellulare, indice di avvenuto differenziamento.

Questo tipo di approccio permetteva di valutare in modo veloce e approssimativo l'avvenuto processo differenziativo tuttavia, considerato anche che queste cellule crescono in sospensione, non potevamo avere informazioni quantitative. Abbiamo quindi deciso di valutare l'aumento di dimensioni cellulari in esperimenti di citofluorimetria a flusso. I campioni raccolti ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento sono stati acquisiti con citofluorimetro FACScan sono stati analizzati in un dot-plot che correla dimensioni cellulari (FSC) e granulosità cellulare (SSC). Com'è possibile osservare in figura 6, già al giorno 3 e in maniera ancor più consistente al giorno cinque, è presente una popolazione di cellule chiaramente differenziate. L'area selezionata (-) rappresenta il gate scelto per le successive analisi: contiene cellule con aumentate dimensioni e complessità cellulare, quindi differenziate.



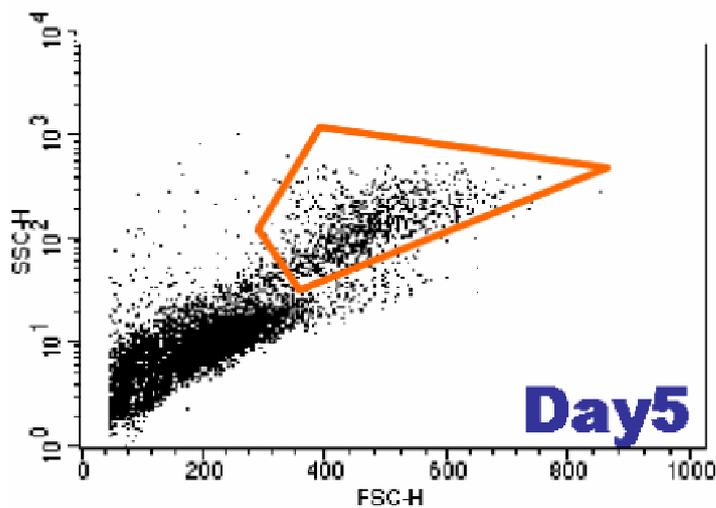
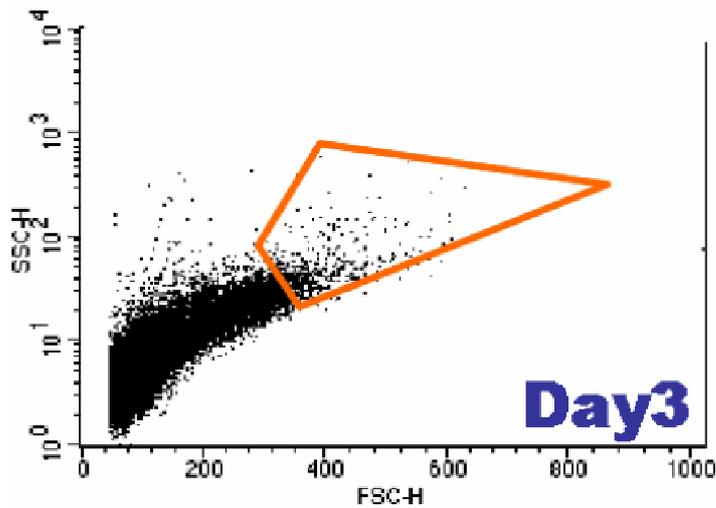
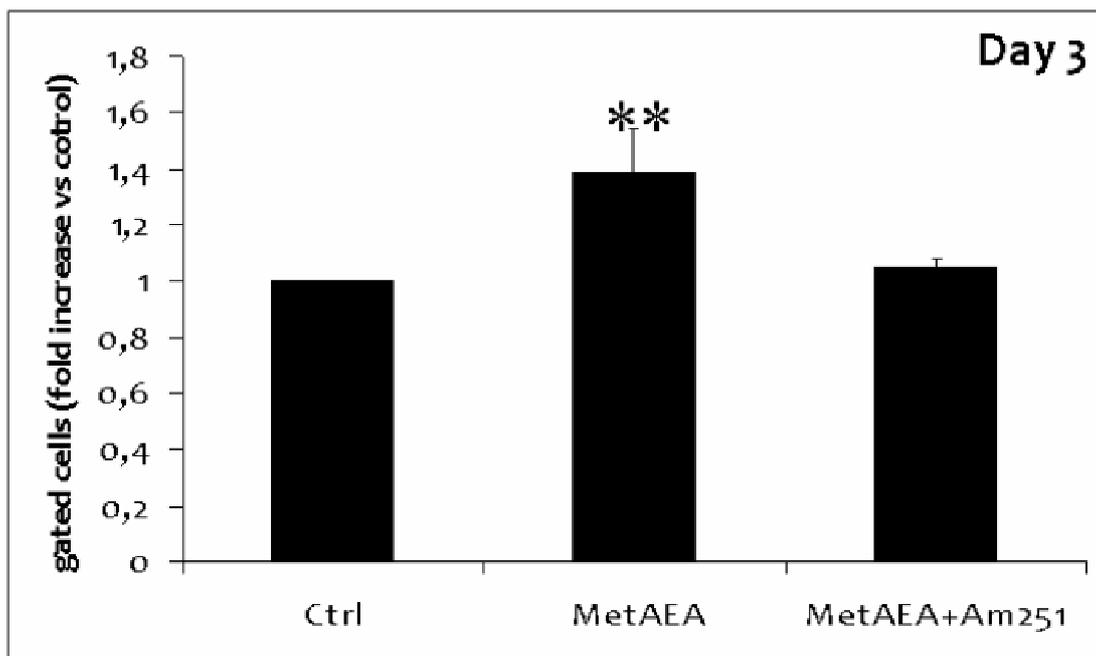


FIG. 6 AUMENTO DI DIMENSIONI CELLULARI DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO – SCATTER PLOT. Le immagini sono rappresentative delle ottenute in tre diversi esperimenti indipendenti. Cellule al giorno 0, 3 e 5 del differenziamento analizzate in citofluorimetria sono state sortate in base alle dimensioni cellulari in un dot-plot FSC - SSC. Come atteso, con il trascorrere del tempo, si osserva un aumento significativo delle dimensioni e complessità delle cellule in fase differenziativa.

Per valutare quindi se gli endocannabinoidi fossero in grado di influire sulle dimensioni cellulari, cellule raccolte al giorno 0 sono state trattate con 10 μ M MetAEA sola o in presenza di 10 μ M Am251 e indotte al differenziamento. I campioni raccolti ai giorni 3 e 5 del differenziamento sono stati raccolti, acquisiti con citofluorimetro FACScan ed infine analizzati con il software CellQuest (Becton Dickinson). Le cellule differenziate raccolte nel gate (-), vedi figura 6, sono state contate. I risultati sono riportati in figura 7: il trattamento con MetAEA aumenta in modo significativo il numero di cellule mature sia al terzo che al quinto giorno del differenziamento. Nei campioni trattati contemporaneamente con MetAEA ed AM251, invece, il numero di cellule differenziate si riporta ai valori basali. Possiamo concludere che l'azione della MetAEA sia dipendente dall'attivazione del CB1.



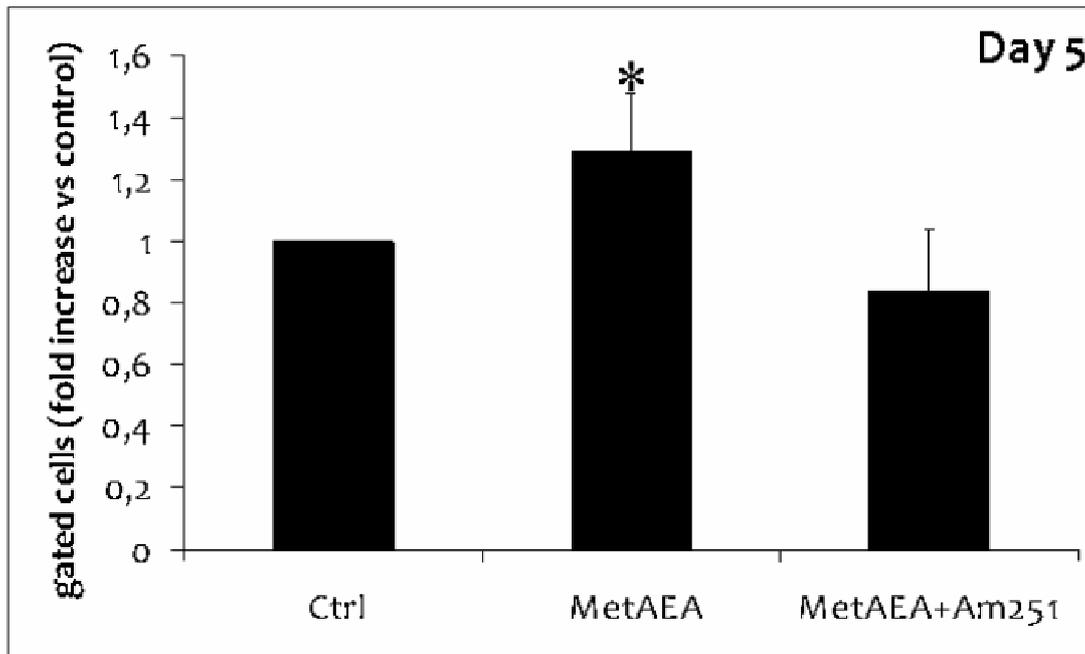


FIG. 7 AUMENTO DI DIMENSIONI CELLULARI DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO. I grafici a barre mostrano il numero di cellule mature ai giorno 3 e 5 del differenziamento in campioni di controllo o messi a differenziare in presenza di MetAEA sola o con AM251. La MetAEA, attraverso il CB1, induce un significativo aumento del numero di cellule mature. I valori sono stati normalizzati rispetto al numero di cellule raccolte nel controllo (valore arbitrariamente posto uguale a 1). Le barre rappresentano la media \pm la deviazione standard di tre diversi esperimenti. L'analisi statistica è stata eseguita con test T-Student (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: espressione CD41

Uno degli eventi che caratterizzano la maturazione ed il differenziamento di una cellula staminale è l'acquisizione ed espressione di marker cellulo-specifici. Nel caso specifico di differenziamento megacariocitico, l'aumento di espressione dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ può essere utilizzato come indicatore dell'avvenuto processo differenziativo. Per valutare se gli endocannabinoidi fossero in grado di influire sul differenziamento cellulare megacariocitario abbiamo valutato, in citofluorimetria, l'espressione di CD41 (αIIb). Le cellule raccolte al giorno 0 sono state trattate con 10 μM MetAEA sola o in presenza di 1 μM AM251 e differenziate. I campioni raccolti come precedentemente descritto sono stati colorati con 10 mg/mL di anticorpo anti-CD41 marcato FITC o rispettivo controllo isotipico e visualizzati nel dot-plot FSC-SSC. Le cellule differenziate raccolte nel gate

arancione (vedi figura 6), sono state selezionate ed analizzate. I nostri dati mostrano che in nessun caso, per nessuno stadio differenziativo considerato, i trattamenti differiscono dal controllo (fig 8).

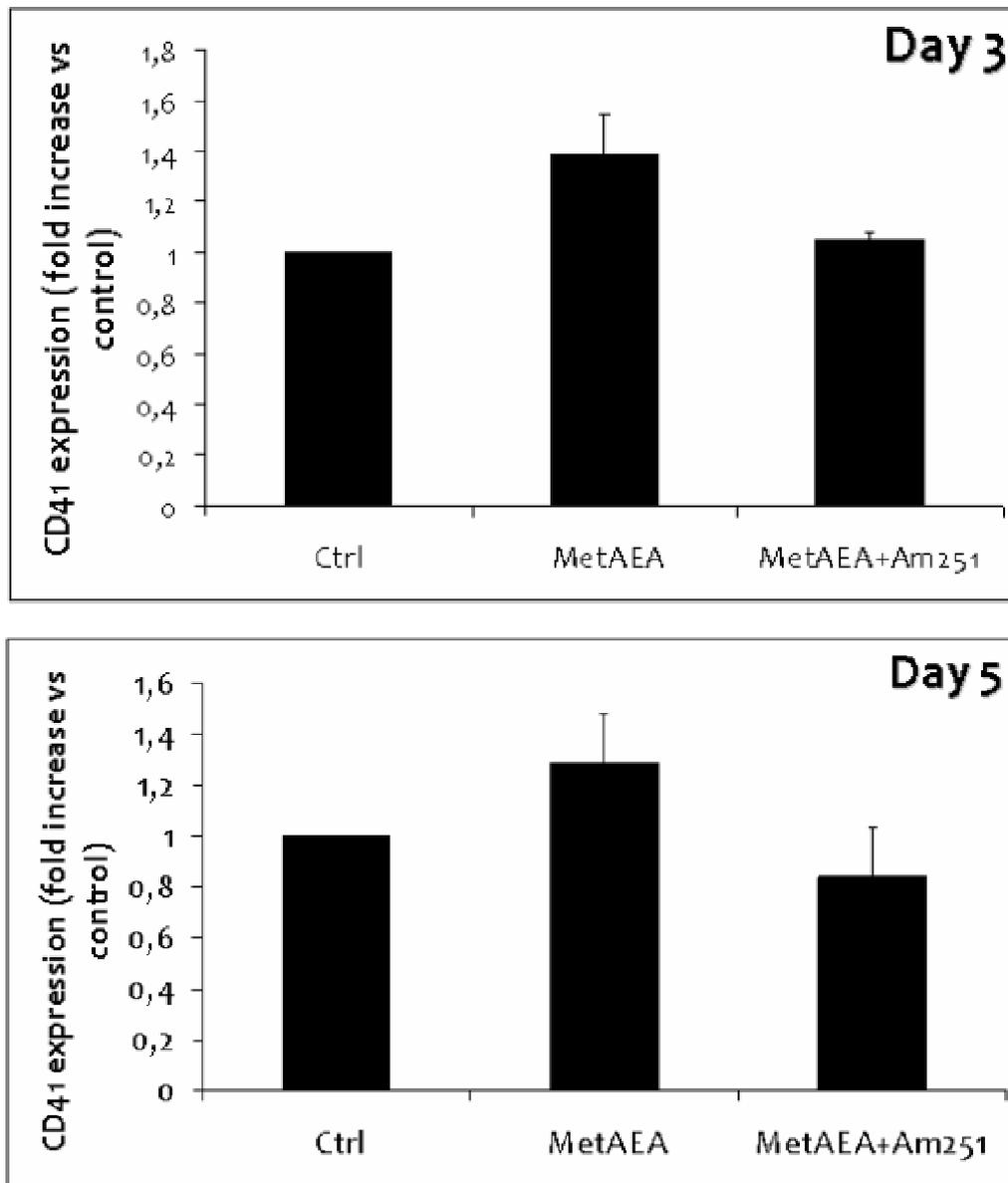


FIG. 8 ESPRESSIONE DI CD41 DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO. I grafici a barre mostrano cellule mature CD41 positive ai giorni 3 e 5 del differenziamento, in campioni di controllo o messi a differenziare in presenza di MetAEA sola o con AM251. In nessun caso, per nessuno stadio differenziativo considerato, i trattamenti differiscono dal controllo. I valori sono stati normalizzati rispetto al controllo (valore arbitrariamente posto uguale a 1). Le barre rappresentano la media \pm la deviazione standard di tre diversi esperimenti.

DISCUSSIONE

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

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

Il mio progetto di lavoro nasce con l'intento di valutare il ruolo degli endocannabinoidi nei processi di megacariocitopoiesi.

Per prima cosa ho quindi deciso di indagare la presenza dei recettori cannabici su megacariociti e piastrine murine. La presenza dei due principali recettori per gli endocannabinoidi, era già stata valutata e descritta nei precedenti anni: particolarmente interessante era risultata essere la forte modulazione di espressione del CB1 che aumentava progressivamente negli stadi differenziativi considerati. Lo studio mancava dell'analisi di espressione del recettore TRPV-1.

La presenza del recettore vanilloide è stata inizialmente indagata in esperimenti di Western Blotting: come visibile dalla figura 1A il recettore sembra essere espresso solo nelle fasi tardive del differenziamento; un analogo esperimenti ha poi dimostrato la presenza del recettore anche in lisati di piastrine murine (figura 1B). La figura 2 mostra i risultati degli esperimenti di real-time PCR che sostanzialmente confermano quanto osservato negli esperimenti di Wester blotting.

Per valutare se gli endocannabinoidi svolgano un ruolo nel differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche murine verso la linea megacariocitaria, ho condotto diversi esperimenti utilizzando tre differenti marcatori del differenziamento megacariocitario: il grado di poliploidizzazione nucleare, l'aumento delle dimensioni cellulari e l'espressione di marker cellulo-specifici.

In particolare la metanandamide (metAEA), analogo sintetico e più stabile dell'anandamide, è stata scelta tra gli endocannabinoidi perché dati riportati in letteratura mostravano un suo coinvolgimento (a differenza del 2-AG) nel differenziamento cellulare e poiché essa agisce preferenzialmente mediante il CB1 (la cui espressione, dai nostri dati di Western blotting e real-time PCR, risultava essere fortemente modulata nel tempo).

Dai dati in nostro possesso il trattamento con metanandamide (Met-AEA) aumenta in modo statisticamente significativo il numero di cellule differenziate sia al giorno 3 che in minor misura, al giorno 5 del differenziamento (fig. 7). L'antagonista sintetico del recettore cannabico di tipo 1 (AM251) quando usato in combinazione con la MetAEA revertiva l'effetto osservato: si conclude che, nel nostro sistema, l'azione biologica della MetAEA sia conseguente all'attivazione del CB1.

Il trattamento con MetAEA invece non influisce né sul grado di poliploidizzazione (fig. 4) né sull'espressione del marker differenziativi CD41 (fig. 8).

Data la forte modulazione di espressione dei recettori cannabici nel corso del differenziamento megacariocitico, e osservando che la MetAEA attraverso il CB1 aumenta in modo significativo il numero di cellule mature presenti nel nostro sistema, possiamo concludere che c'è un sicuro coinvolgimento del sistema endocannabinoidale nel processo differenziativo preso in esame. Rimangono tuttavia da chiarire quali siano le vie di segnalazione intracellulari attivate a valle del recettore cannabico di tipo 1 durante questo processo.

**La successiva sezione è dedicata al secondo argomento trattato:
“GLI ENDOCANNABINOIDI E LA FUNZIONALITA’ PIASTRINICA”**

GLI ENDOCANNABINOIDI E LA FUNZIONALITA' PIASTRINICA

Le piastrine o trombociti sono piccoli frammenti cellulari anucleati di forma irregolare aventi un diametro di 2-4 μm . Come ampiamente descritto nella precedente sezione, esse derivano da cellule poliploidi localizzate nel midollo osseo chiamate megacariociti. La concentrazione di piastrine circolanti è di 150.000-350.000 per μl di sangue e hanno una vita media di circa 10 giorni, al termine dei quali vengono fagocitate da macrofagi, soprattutto a livello del fegato e della milza (*Kile et al., 2009*).

La funzione primaria delle piastrine è quella di prevenire le emorragie in presenza di un danno alla parete vascolare. Esse hanno un ruolo, oltre che nell'emostasi primaria, anche nel processo coagulativo ed infiammatorio ed intervengono inoltre nella risposta immunitaria (*Von Hundelshausen et al., 2007*).

Nell'ultima decade una serie di studi si è focalizzata sulla funzionalità piastrinica rilevando che, inaspettatamente, i trombociti possiedono una grande varietà di recettori e prodotti secretori in aggiunta a quelli necessari per i classici eventi trombotici ed emostatici. In particolare i dati raccolti suggeriscono che le piastrine sono coinvolte nell'eziologia di diverse malattie neurovascolari tra le quali: eventi ischemici (*De Pergola et al., 2002, Huo Y., et al., 2003*), ischemia della retina (*Leoncini et al., 2009*), sclerosi multipla (*Horstman et al., 2010*) ed emicrania (*Greco et al., 2010*). E' ampiamente dimostrato inoltre che l'attivazione ed aggregazione piastrinica sono fortemente alterati nella depressione, un disturbo neurologico che, con l'infarto miocardico e i disturbi cerebrovascolari, è una delle maggiori cause di morte nella società occidentale (*Randall et al., 2007, Ziegelstein et al., 2009*).

Evidenze dimostrano che l'AEA e il 2-AG, i due principali endocannabinoidi, sono rilasciati da piastrine, cellule endoteliali ed altre cellule del sangue (*Randall et al., 2007, Pacher et al., 2008, Kunos et al., 2009*). In particolare AEA e 2-AG sono molecole che si comportano da vaso rilassanti (*Batkai et al., 2009*), immunomodulatori (*Croxford et al., 2005*), fattori di crescita (*Valk et al., 1997*), ed attivatori piastrinici (*Baldassarri et al., 2008*).

E' inoltre noto che le piastrine umane rispondono differenzialmente a AEA e 2-AG: l'anandamide infatti si comporta da co-agonista piastrinico: in sinergia con altri composti induce aggregazione piastrinica anche a basse dosi ma, quando usata sola, deve essere somministrata ad alte concentrazioni nell'ordine del millimolare (quindi troppo elevate e

non fisiologiche) (*Maccarrone et al., 2002*). Il 2-AG invece è un reale agonista piastrinico di per sé: utilizzato anche basse concentrazioni, nell'ordine del micromolare, induce aggregazione piastrinica (*Baldassarri et al., 2008*).

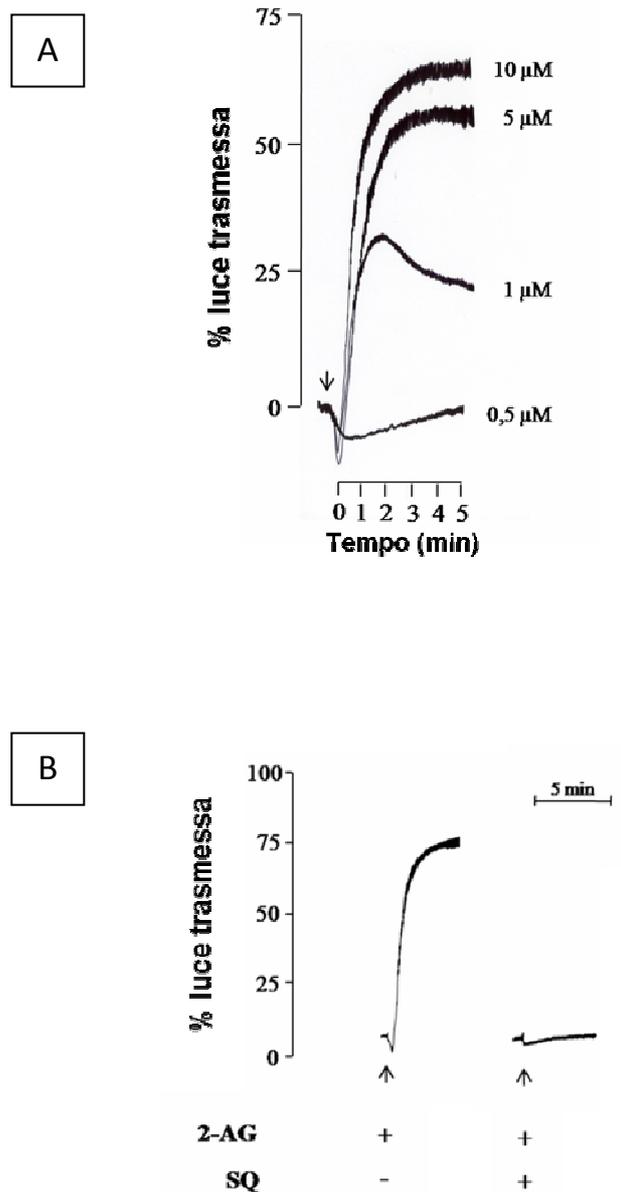
Le piastrine, inoltre, sono in grado attraverso processi di sintesi, rilascio e degradazione, di regolare le concentrazioni locali di endocannabinoidi.

Studi recentemente riportati in letteratura evidenziano una forte correlazione tra endocannabinoidi, funzionalità piastrinica e stati infiammatori: le piastrine sono infatti coinvolte, come già detto, anche nella patogenesi di malattie infiammatorie, allergiche e tumorali. In seguito all'esposizione ad agenti patogeni o allergeni vanno incontro a chemotassi, esprimono molecole di adesione, rilasciano una gran quantità di mediatori pro-infiammatori, enzimi e proteine che favoriscono l'attivazione di cellule coinvolte nella risposta immunitaria e nell'infiammazione (*Steinhubl et al., 2007*).

Stati fisiopatologici dimostrano che, in tali condizioni, variano anche le concentrazioni locali di endocannabinoidi: la velocità di sintesi e liberazione di 2-AG da parte delle piastrine, per esempio, è notevolmente incrementata dalla presenza del fattore attivante le piastrine (PAF) (*Berdyshev et al., 2001*), da stimoli infiammatori di varia natura (come i lipopolisaccaridi delle membrane batteriche) o semplicemente da concentrazioni fisiologiche dello stesso 2-AG (*Berdyshev et al., 2001; Maccarrone et al., 2001, Maccarrone et al., 2002, Maccarrone et al., 2003*).

L'azione degli endocannabinoidi quindi, in combinazione con quella di agonisti piastrinici deboli o di molecole che a loro volta modulano l'attività piastrinica, contribuisce notevolmente alla modulazione della funzionalità piastrinica stessa.

Studi svolti nel nostro laboratorio (*Baldassarri et al., 2008*) dimostrano che il 2-AG è in grado di indurre aggregazione piastrinica in modo dose-dipendente. Tale aggregazione dipende inoltre dalla presenza di trombossanoA₂: pretrattando le piastrine con SQ29,548, specifico antagonista del recettore del trombossanoA₂, non si osserva più aggregazione piastrinica indotta da 2-AG.



A) Aggregazione dose-dipendente indotta da 2-AG. B) Aggregazione indotta da 2-AG 10 μM in presenza o assenza dell'inibitore del recettore del trombossanoA₂ (SQ29,548).

SCOPO DEL LAVORO

Come precedentemente descritto il 2-AG è in grado di indurre un'aggregazione piastrinica dipendente dalla sintesi di trombossano A₂ (ed indipendente dal legame con i classici recettori degli endocannabinoidi).

Studi riportati in letteratura riportano che il 2-AG, nelle piastrine, può essere metabolizzato prevalentemente da MAGL ma anche da FAAH e COX-2 per ottenere acido arachidonico il quale può, a sua volta, essere rapidamente convertito in trombossano A₂ (potente agonista piastrinico).

Ipotizzando che l'attivazione piastrinica da 2-AG sia attribuibile al suo stesso catabolismo, abbiamo deciso di meglio caratterizzare il contributo di tale metabolizzazione nell'indurre attivazione piastrinica.

Dato poi che il 2-AG può isomerizzare a 1-AG, substrato degli stessi enzimi catabolici, abbiamo esteso i nostri studi anche a questo stereoisomero.

METODI

PREPARAZIONE DELLE PIASTRINE

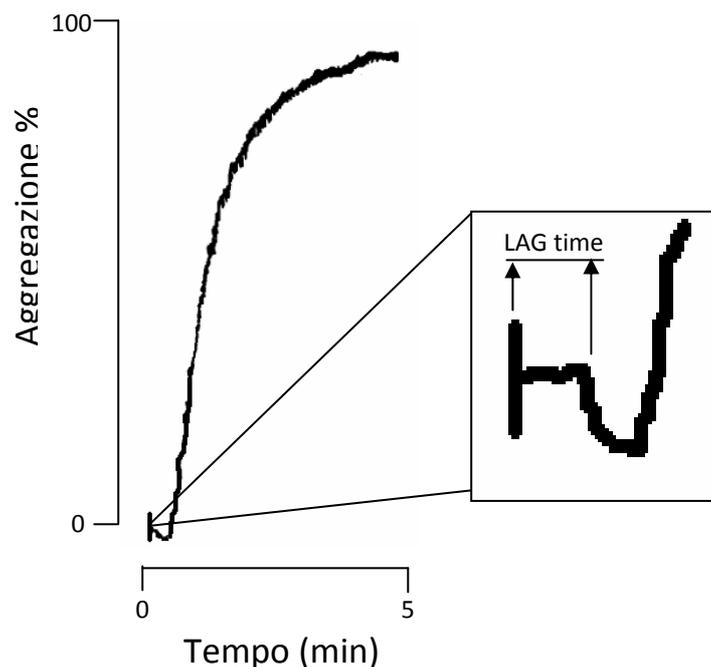
Il sangue (20-40 mL) viene prelevato da donatori sani di età compresa tra i 20 e i 35 anni che non abbiano assunto farmaci nei dieci giorni precedenti al prelievo. Come anticoagulante è stato utilizzato ACD (130 mM acido citrico, 152 mM citrato trisodico, 112 mM D-glucosio) nella proporzione di una parte ogni nove di sangue. Il sangue prelevato viene aliquotato e centrifugato su rotore oscillante a 120xg per 15 minuti, senza freno, a temperatura ambiente, al fine di ottenere il plasma ricco in piastrine (PRP) separato da globuli bianchi e rossi. Il PRP raccolto viene sottoposto ad una seconda centrifuga a 300xg per 15 minuti a temperatura ambiente: si ottiene il plasma povero in piastrine (PPP), che viene eliminato, ed un pellet di piastrine che viene risospeso in poche gocce di ACD. Le piastrine così risospese vengono raccolte in un'unica provetta e, per separarle dalle componenti plasmatiche, caricate in una colonna (K9/30 Column Amersham) con fase solida Sepharose CL-2B e fase liquida tampone Tyrode (10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 5,5 mM Glucosio pH 7.4). Le piastrine eluite vengono contate al microscopio ottico su camera di Burker ad ingrandimento 40X e portate alla concentrazione desiderata utilizzando tampone Tyrode. Prima di essere utilizzate per gli esperimenti le piastrine vengono fatte riposare per circa 30 minuti a temperatura ambiente.

STUDIO DELL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA

L'aggregazione piastrinica viene misurata tramite un aggregometro della Chrono Log Corporation (Mascia Brunelli). Il metodo di analisi si basa sulla misurazione prolungata nel tempo della trasmittanza di una sospensione piastrinica: all'aggiunta di sostanze che inducono aggregazione, si osserva un graduale aumento della trasmittanza, dovuto alla formazione degli aggregati. Ogni canale dispone di due pozzetti separati: uno per il campione (0% di trasmittanza) e uno per il riferimento (tampone Tyrode - 100% di

trasmissione). L'aggregazione ottica è proporzionale alla differenza di trasmissione misurata in continuo fra il campione e il riferimento. La percentuale di aggregazione piastrinica viene monitorata in continuo, su un registratore a carta millimetrata, fino a 5 minuti dall'aggiunta dell'agonista. La temperatura viene mantenuta costante a 37° C e i campioni di piastrine vengono agitati magneticamente a 500 rpm. La fonte luminosa dello strumento è una lampada a tungsteno. L'aggregazione viene misurata in campioni di piastrine gel-filtrate (3×10^8 cellule/mL) aggiunti di 2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂ e 2mM glucosio, utili al mantenimento della funzionalità piastrinica.

Dal tracciato ottenuto dallo strumento è possibile analizzare, oltre alla percentuale di aggregazione, il LAG time. Tale valore indica l'intervallo di tempo trascorso tra l'aggiunta dell'agonista e l'inizio del cambio di forma piastrinico (vedi figura sottostante).



ESEMPIO DI UN TRACCIATO DI AGGREGAZIONE

ANALISI DELLA FOSFORILAZIONE PROTEICA

Piastrine gel-filtrate vengono portate alla concentrazione di 1×10^9 /mL con tampone Tyrode, aliquotate in eppendorf e mantenute a 37°C. Le piastrine sono poi opportunamente stimulate e le reazioni bloccate tramite Leammi Buffer 3X (6 % SDS, 1,5 % β -mercaptoetanolo, 30 % glicerolo, 0,03 % blu di bromofenolo) addizionato di inibitori di proteasi e fosfatasi (3X mix di inibitori proteasi, 9 mM glicerolo fosfato, 20 mM sodio pirofosfato, 3 mM ortovanadato, 30 mM sodio fluoruro, 3 mM EGTA). I campioni, immediatamente agitati su vortex, sono messi in ghiaccio per 15 minuti ed infine scaldati a 95°C per 3 minuti. Le proteine vengono separate mediante corsa su gel lineare di poliacrilamide, trasferite su membrana di polivinilidene di fluoruro (PVDF) ed analizzate tramite Immunoblotting con specifici anticorpi.

RISULTATI

L'INIBITORE DELLA MAGL RITARDA L'INIZIO DELL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA INDOTTA DA 2-AG

Il 2-AG viene metabolizzato da diversi enzimi in glicerolo ed acido arachidonico. L'enzima che maggiormente contribuisce alla metabolizzazione del 2-AG ad acido arachidonico è, nel cervello, la monoacilglicerolo lipasi (MAGL). Ipotizzando che questo enzima sia coinvolto nella metabolizzazione del 2-AG anche nelle piastrine, abbiamo deciso di studiare l'effetto di JZL184 (inibitore della MAGL), sull'aggregazione piastrinica indotta da 2-AG. Piastrine gel-filtrate sono state pretrattate con diverse concentrazioni di JZL184: 50 nM (bassa concentrazione), 100 nM (concentrazione che blocca la maggior parte dell'enzima nel topo), 1 μ M (concentrazione ottimale nell'uomo) e 10 μ M (concentrazione che inibisce, in modo aspecifico, anche altre idrolasi). Piastrine pretrattate con JZL184 o con il rispettivo controllo (DMSO 0,002%) per 30', sono state successivamente stimulate con 2-AG 10 μ M, i tracciati ottenuti sono mostrati in figura 1: in nessun caso è stata osservata un'inibizione dell'aggregazione piastrinica la quale, però, risulta essere ritardata in modo proporzionale alla concentrazione di JZL184 utilizzata. Il pretrattamento con 10 μ M JZL184 provoca una leggera diminuzione dell'aggregazione piastrinica probabilmente dovuta agli effetti aspecifici dell'inibitore; l'aggregazione non viene comunque inibita.

1 μ M di JZL184 è la concentrazione di inibitore a cui si osserva un maggiore ritardo; considerato poi che è anche la concentrazione riportata in letteratura essere ottimale nell'uomo, tutti i successivi esperimenti sono stati condotti utilizzando 1 μ M JZL184.

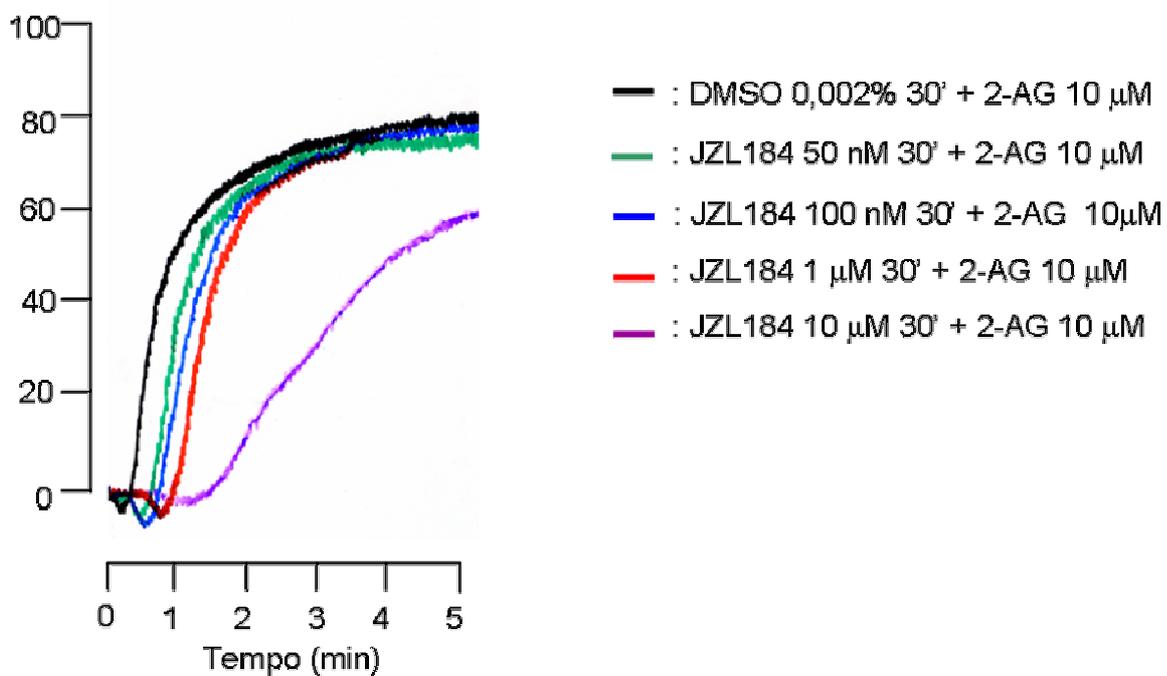


FIGURA 1. AGGREGAZIONE DA 2-AG IN PRESENZA DI DOSI CRESCENTI DELL'INIBITORE DELLA MONOACILGLICEROLO LIPASI. Piastrine gel-filtrate sono state pretrattate con concentrazioni crescenti di JZL184 (da 50 nM a 10 μ M) o con solvente (DMSO 0,002%) per 30 minuti e poi stimulate con 10 μ M 2-AG. I risultati sono espressi come percentuale di luce trasmessa; l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista. Il tracciato è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti. Per tutte le concentrazioni utilizzate JZL184 ritarda l'aggregazione indotta da 2AG (ma non ha effetti inibitori).

Tutti gli esperimenti realizzati sono stati analizzati valutando eventuali variazioni nella percentuale di aggregazione e del LAG time (intervallo di tempo tra l'aggiunta dell'agonista e l'inizio dell'aggregazione). Da questa analisi (figura 2A) non emerge una differenza statisticamente significativa nella percentuale di aggregazione tra i due campioni ($p = 0,96$). C'è invece una forte modulazione del LAG time (figura 2B): nel caso del solo 2-AG (in assenza di JZL184) va da 3 a 8 secondi; in presenza dell'inibitore JZL184 varia invece dai 23 a 36 secondi. Il pretrattamento con l'inibitore della MAGL causa quindi un ritardo nell'inizio dell'aggregazione indotta da 2-AG (ma non un'inibizione).

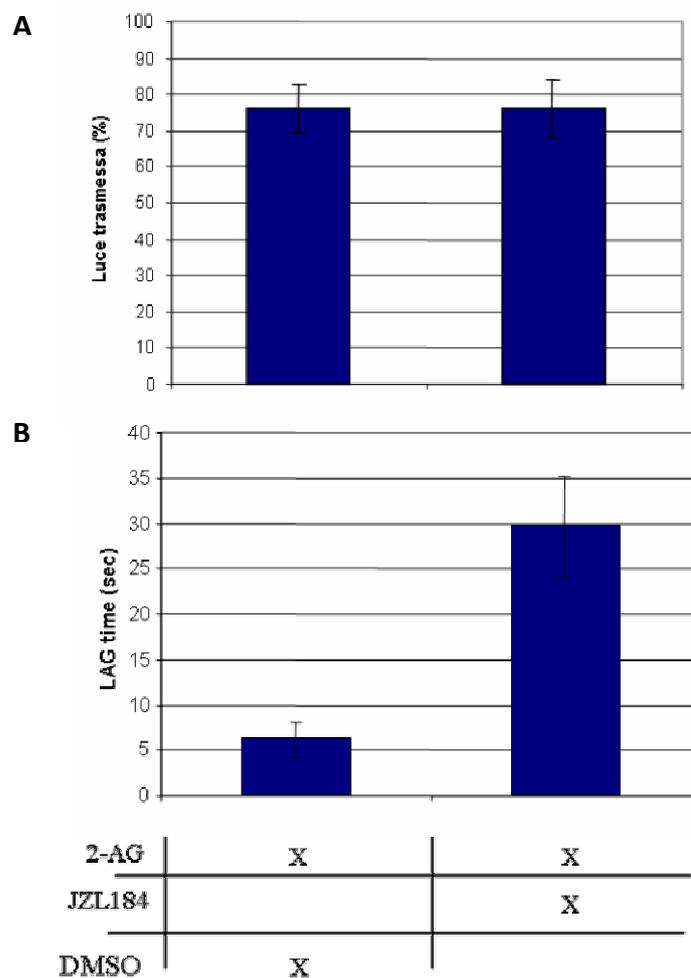


FIGURA 2. EFFETTI DELL'INIBITORE DELLA MAGL (JZL184) SULL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA 2-AG DIPENDENTE. Analisi della percentuale di aggregazione (A) e del LAG time (B) di piastrine gel-filtrate pretrattate con $1\mu\text{M}$ JZL184 o $0,002\%$ DMSO per 30' e poi stimulate con $10\mu\text{M}$ 2-AG. Come mostrato in figura (A), il pretrattamento con JZL184 non modifica l'intensità dell'aggregazione indotta da 2-AG. Il pretrattamento con JZL184 aumenta invece in modo statisticamente significativo il LAG time (pannello B). I risultati sono espressi come la media \pm deviazione standard di 5 esperimenti; analisi statistica eseguita con t-Student (** $p < 0,01$).

L'aumento di luce trasmessa rilevata dall'aggregometro può essere dovuta, oltre che ad una vera e propria aggregazione dipendente dall'attivazione dell'integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, anche a semplici fenomeni di agglutinazione o di lisi cellulare. Per valutare se l'aumento di trasmittanza indotto da 10 μM 2-AG in presenza di 1 μM JZL184 rappresentasse una reale aggregazione (dipendente dall'interazione tra l'integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ e il fibrinogeno), piastrine gel-filtrate sono state pretrattate, oltre che con l'inibitore della MAGL nelle condizioni precedenti, anche con 0,5 mM del peptide GRGDS per 3 minuti, e poi stimulate con 10 μM 2-AG. Nel campione pretrattato con il peptide, si osserva un blocco dell'aggregazione da 2-AG seppur vengano mantenuti sia l'iniziale cambio di forma che l'aumento del LAG time dovuto all'inibitore JZL184 (Fig. 3). I risultati ci fanno quindi concludere che, anche in presenza dell'inibitore della MAGL alla concentrazione di 1 μM , il 2-AG è in grado di indurre una reale aggregazione piastrinica (non dovuta a fenomeni aspecifici che portano ad aumento della trasmittanza).

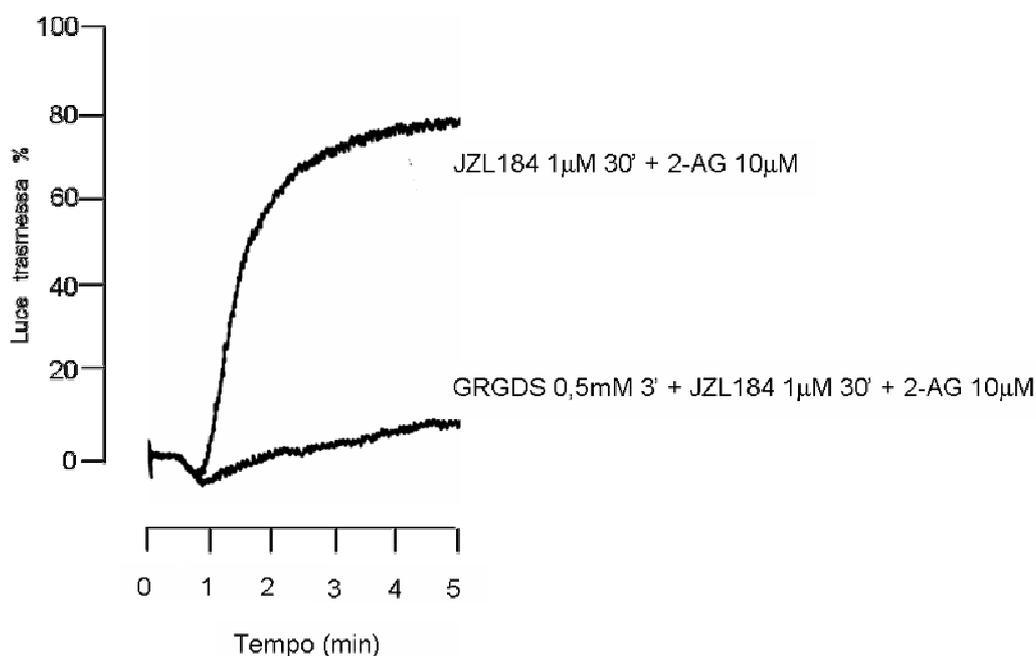


FIGURA 3. L'AGGREGAZIONE PIASTRINICA INDOTTA DA 2-AG IN PRESENZA DI JZL184 E' DIPENDENTE DALL'INTEGRINA $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Piastrine gel-filtrate sono state pretrattate con 0,5 mM GRGDS e/o 1 μM JZL184 e poi stimulate con 2-AG. I risultati sono espressi come percentuale di luce trasmessa e l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista. Il tracciato è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti.

GLI INIBITORI DEGLI ENZIMI CHE INTERVENGONO NELLA METABOLIZZAZIONE DEL 2-AG NON DETERMINANO UN'INIBIZIONE DELL'AGGREGAZIONE INDOTTA DALL'ENDOCANNABINOIDE

La MAGL è il principale enzima responsabile della metabolizzazione del 2-AG ma non l'unico. In questo processo intervengono infatti anche l'idrolasi delle ammidi degli acidi grassi (FAAH) e la ciclossigenasi-2 (COX-2). Per tale motivo abbiamo deciso di studiare l'aggregazione piastrinica indotta da 2-AG in presenza degli inibitori di questi enzimi sia singolarmente che in combinazione (figura 4). URB597 è stato utilizzato come inibitore della FAAH; CAY10404 inibisce invece in modo specifico la COX-2 se utilizzato 1 μ M (500 μ M CAY10404 inibisce anche COX-1). Osservando il tracciato in figura 4 è evidente che, anche in presenza dei vari inibitori, l'aggregazione da 2-AG non è inibita ma solo rallentata; il LAG time è massimo nell'aggregazione in presenza di 1 μ M JZL184. Alla luce di questi dati concludiamo che l'aggregazione indotta da 2-AG non è totalmente dipendente dalla sua stessa metabolizzazione.

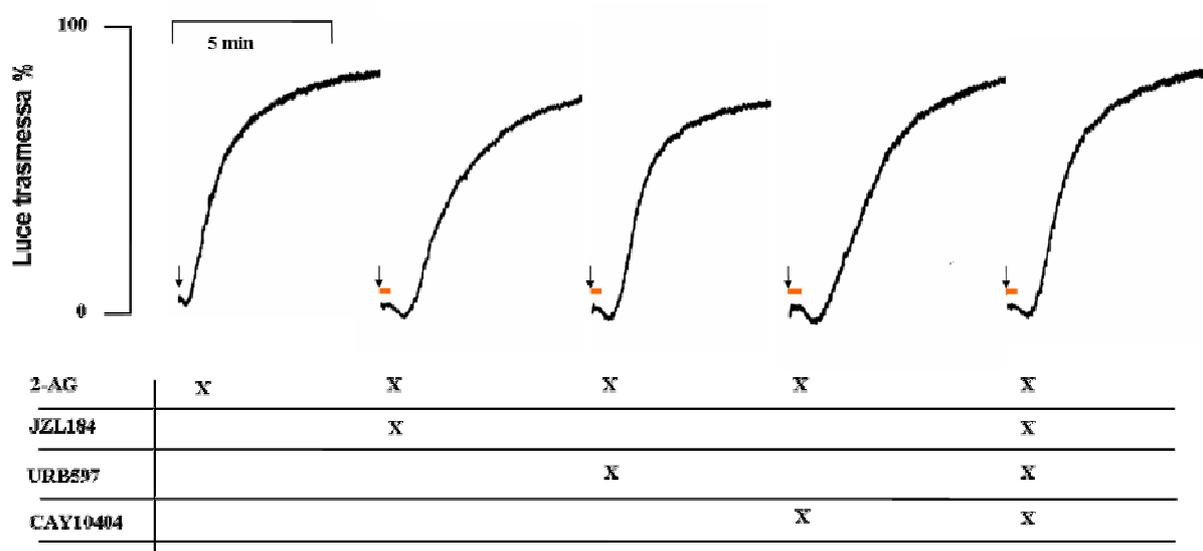


FIGURA 4. AGGREGAZIONE PIASTRINICA INDOTTA DA 2-AG IN PRESENZA DEGLI INIBITORI DEL CATABOLISMO DEL 2-AG. Piastrine gel-filtrate sono state pretrattate dove indicato con 1 μ M JZL184 30', 1 μ M URB597 (inibitore di FAAH) 30', 1 μ M CAY10404 (inibitore di COX-2) 10' e poi stimolate con 2-AG 10 μ M. I risultati sono espressi come percentuale di luce trasmessa e l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista. I tracciati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. Nessuno degli inibitori utilizzati riduce l'aggregazione indotta da 2-AG. Il pretrattamento con tali inibitori, invece, aumenta il LAG time (-): il tempo che intercorre dall'aggiunta dell'agonista (freccia nera) al cambio di forma piastrinico, è aumentato.

JZL184 PROVOCA UN RITARDO NELLA FOSFORILAZIONE PROTEICA INDOTTA DA 2-AG

Un importante meccanismo di trasduzione del segnale indotto dagli agonisti piastrinici durante l'attivazione piastrinica è la fosforilazione di differenti proteine su residui di tirosina o serina/treonina. Per confermare i dati di aggregazione, abbiamo studiato la fosforilazione proteica indotta da 2-AG solo o in cellule pretrattate con JZL184.

1×10^9 piastrine gel-filtrate/mL, sono state pre-trattate con $1 \mu\text{M}$ JZL184 o 0,002% DMSO, per 30 minuti, a 37°C . Terminato il tempo di incubazione i campioni sono stati stimolati con $10 \mu\text{M}$ 2-AG per tempi diversi (15'', 1', 3' e 5'), lisati, dissociati ed analizzati mediante Immunoblotting, utilizzando gli specifici anticorpi indicati in figura 5.

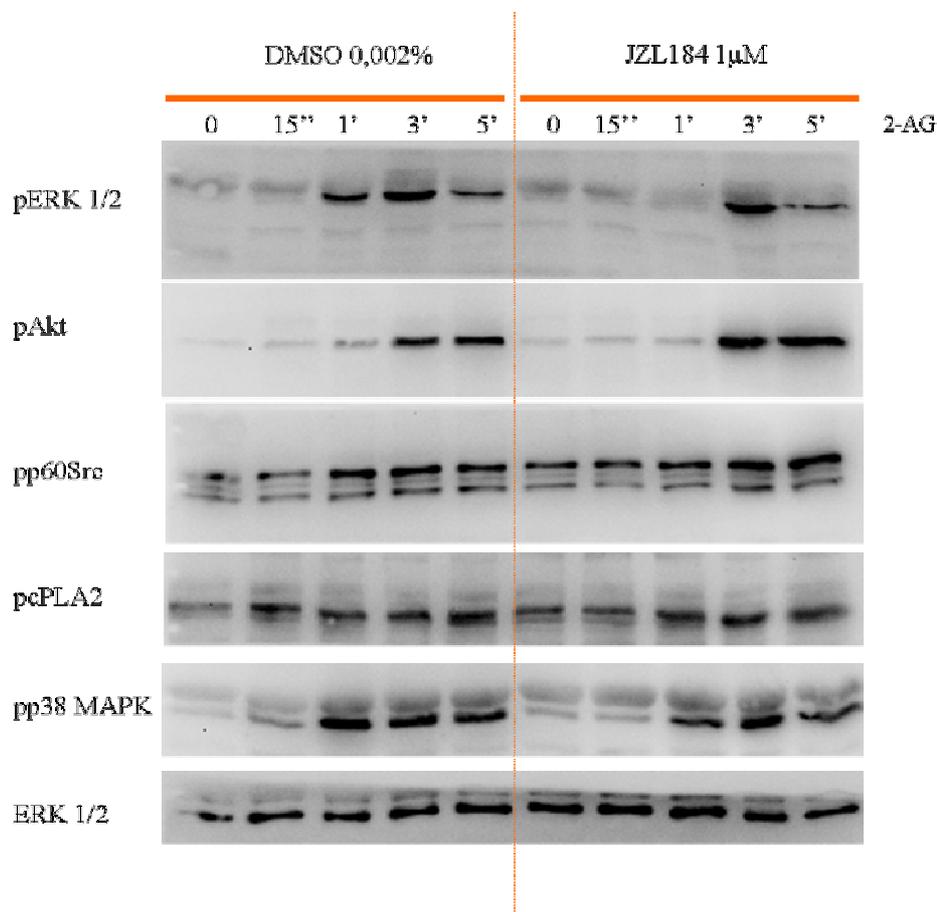


Figura 5. EFFETTI DELL'INIBITORE DELLA MAGL SULLA FOSFORILAZIONE PROTEICA INDOTTA DA 2-AG. Analisi della fosforilazione di Erk1/2, Akt, p60Src, cPLA2 e p38MAPK in campioni di piastrine gel-filtrate pretrattate con 0,002% DMSO o $1 \mu\text{M}$ JZL184 per 30' e poi stimulate con $10 \mu\text{M}$ 2-AG. La quantità di proteina totale è rappresentata da Erk1/2. Il 2-AG induce una fosforilazione tempo-dipendente di tutte le proteine analizzate. Il pretrattamento con JZL184 causa un ritardo, ma non una diminuzione, della fosforilazione indotta da 2-AG.

1-AG INDUCE UN' AGGREGAZIONE DOSE-DIPENDENTE

Il 2-AG è una molecola che può andare incontro ad isomerizzazione, al termine della quale si forma l'1-arachidonoilglicerolo (1-AG). Questo stereoisomero è anch'esso in grado di interagire con la MAGL, con un'affinità del tutto simile a quella del 2-AG (IC₅₀ = 17 μ M 2-AG e 13 μ M 1-AG), determinando la formazione di acido arachidonico. A differenza del 2-AG, il suo isomero non è un'endocannabinoide ed è in grado di legare i recettori CB1 e CB2 solo a concentrazioni molto elevate. Per estendere i nostri studi anche all'1-AG, abbiamo inizialmente valutato se (e a quali concentrazioni) l'1-AG fosse in grado di indurre aggregazione piastrinica. Piastrine gel-filtrate sono state stimolate con concentrazioni crescenti di 1-AG (1 μ M, 3 μ M, 5 μ M e 10 μ M); i risultati ottenuti sono mostrati in figura 6A. Dai tracciati si osserva che l'1-AG induce aggregazione piastrinica in modo dose-dipendente e che la percentuale massima di aggregazione si osserva per la concentrazione più elevata (10 μ M), che è per questo stata utilizzata in tutti i successivi esperimenti. È stato anche verificato che l'aggregazione da 1-AG fosse dipendente dall'attivazione dell'integrina α IIb β 3, (Fig. 6B).

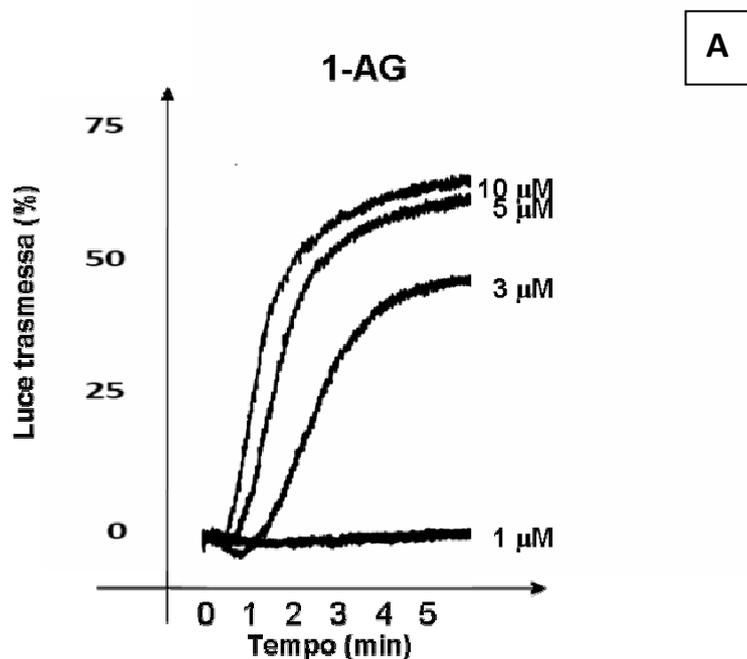


Figura 6 A: AGGREGAZIONE DOSE-DIPENDENTE DA 1-AG. Piastrine gel-filtrate sono state stimolate con differenti concentrazioni crescenti di 1-AG. I risultati sono espressi come percentuale di luce trasmessa e l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista. I tracciati, rappresentativi di tre esperimenti indipendenti, mostrano che l'1-AG induce aggregazione piastrinica in modo dose-dipendente.

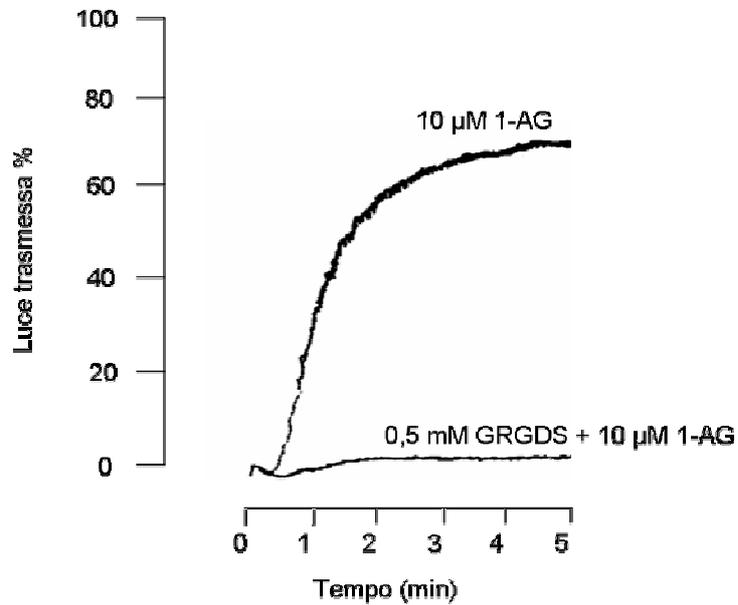
B

FIGURA 6B. L'AGGREGAZIONE PIASTRINICA INDOTTA DA 1-AG E' DIPENDENTE DALL'INTEGRINA α II β 3. Piastrine gel-filtrate sono state pretrattate con 0,5 mM GRGDS e poi stimulate con 10 μ M 1-AG. I risultati sono espressi come percentuale di luce trasmessa e l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista. Il tracciato è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti.

L'AGGREGAZIONE INDOTTA DA 1-AG E' PARAGONABILE ALL'AGGREGAZIONE INDOTTA DAL 2-AG

Al fine di valutare differenze nei tracciati di aggregazione da 1-AG e 2-AG, campioni di piastrine gel-filtrate (3×10^8 /mL) sono stati stimolati con 10 μ M 1-AG o 2-AG. I risultati ottenuti (percentuale di aggregazione e LAG time), sono riportati in figura 7. Non si osservano variazioni significative nei parametri considerati a seconda dello stereoisomero utilizzato.

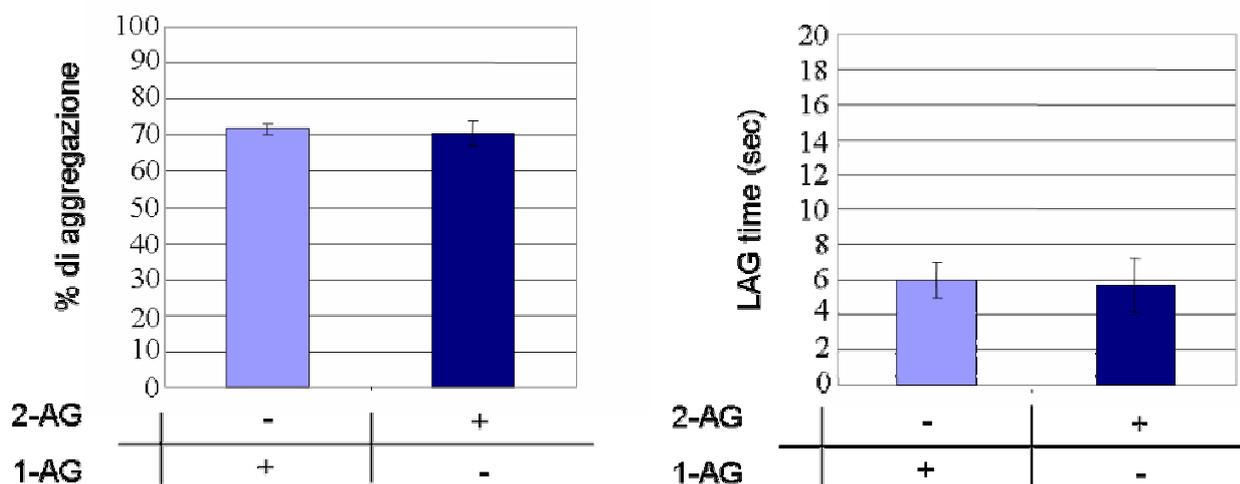


Figura 7 CONFRONTO TRA L'AGGREGAZIONE PIASTRINICA INDOTTA DA 1-AG e 2-AG. Piastrine gel-filtrate sono state stimolate con 10 μ M di 1-AG o 2-AG. L'analisi della percentuale di aggregazione e del LAG time dei tracciati di aggregazione dei due agonisti sono riportati in figura. I risultati sono espressi come la media \pm deviazione standard di 3 esperimenti. Il calcolo del t-Student relativo alla percentuale di aggregazione e al LAG time non ha individuato differenze statisticamente significative ($p = 0,67$ e $p = 0,76$ rispettivamente).

Come già accennato, è stato dimostrato che l'aggregazione data da 2-AG è dipendente da trombossanoA₂ (Baldassarri et al., 2008). Per verificare se anche l'aggregazione indotta da 1-AG fosse tale, piastrine gel-filtrate sono state pretrattate per 1' con 1 μM SQ 29,548 (inibitore del recettore del trombossanoA₂), e poi stimulate con 10 μM 1-AG (figura 8). L'aggregazione da 1-AG è dipendente da trombossanoA₂.

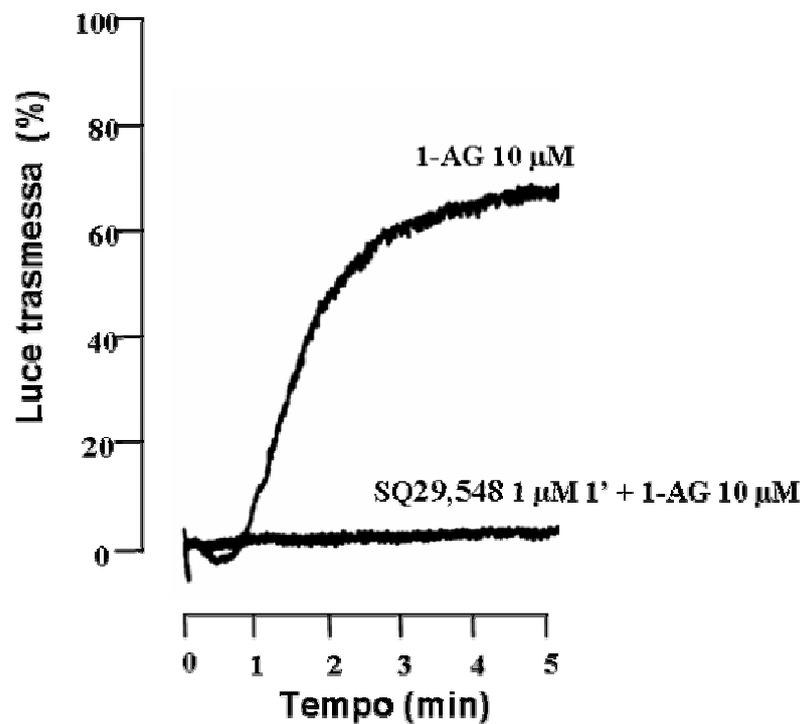


Figura 8. L'AGGREGAZIONE INDOTTA DA 1-AG E' DIPENDENTE DALLA FORMAZIONE DI TROMBOSSANO A₂. Piastrine gel-filtrate sono state stimulate con 10 μM 1-AG e/o pretrattate con 1 μM SQ 29,548 per 1 minuto. I risultati sono espressi come percentuale di luce trasmessa e l'aggregazione è stata seguita per 5 minuti dopo l'aggiunta dell'agonista. Il tracciato è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti. L'aggregazione da 1-AG, come nel caso del 2-AG, è dipendente dalla produzione di trombossanoA₂.

LA FOSFORILAZIONE PROTEICA INDOTTA DA 1-AG DIFFERISCE DA QUELLA DATA DA 2-AG

Dopo avere osservato che l'aggregazione da 10 μM 1-AG o 2-AG erano paragonabili, abbiamo deciso di analizzare se fosse simile anche il pattern di fosforilazione indotto da entrambe i lipidi. Piastrine gel-filtrate sono state portate alla concentrazione di $1 \times 10^9/\text{mL}$, mantenute a 37°C e stimolate con 10 μM 1-AG o 2-AG per tempi crescenti (0, 15", 1', 3' e 5'). I campioni così ottenuti sono stati lisati come precedentemente descritto, caricati su gel di poliacrilamide, trasferiti su membrana di PVDF e colorati con i seguenti anticorpi: α -pErk1/2, α -pAkt, α -pp38MAPK, α -pcPLA2, α -pp60Src e α -Erk1/2 (figura 9).

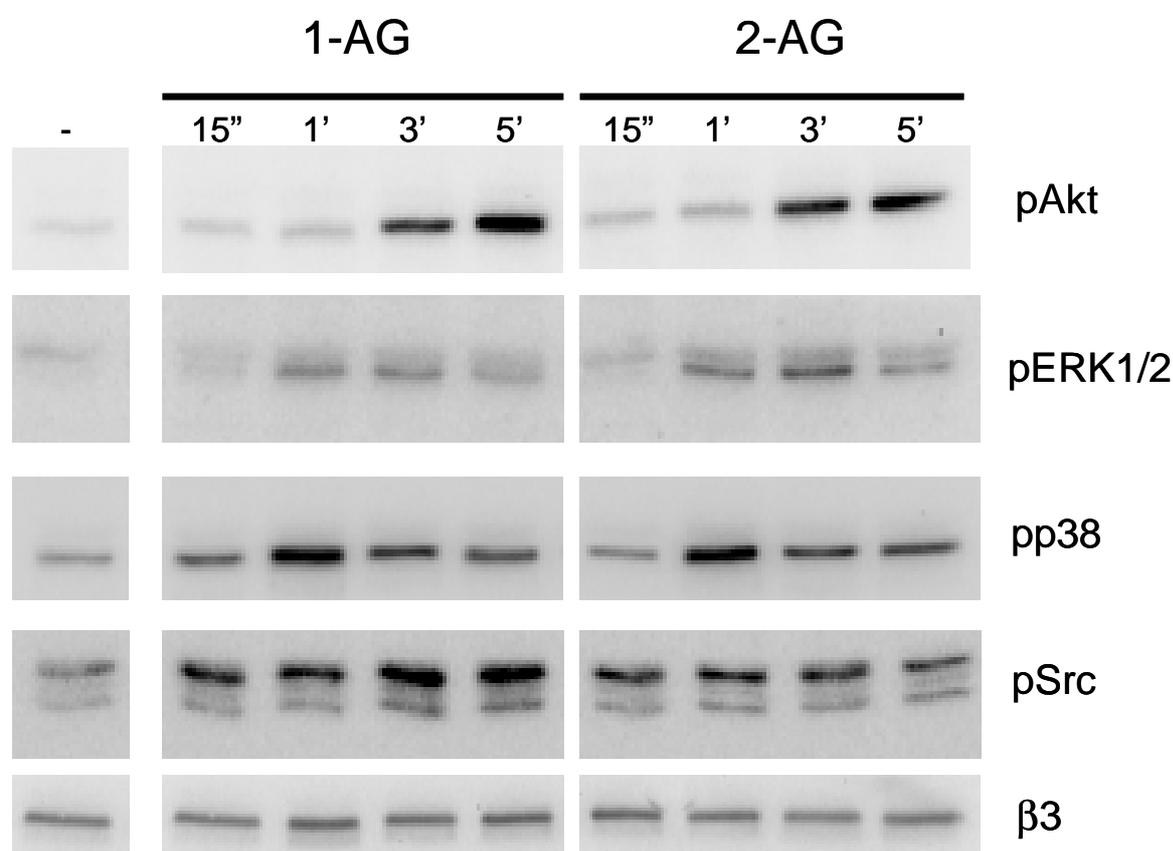


Figura 9. 1-AG E 2-AG INDUCONO DIVERSI PATTERN DI FOSFORILAZIONE PROTEICA. Piastrine gel-filtrate sono state stimolate con 10 μM 1-AG o 2-AG per tempi crescenti. Aliquote di ciascun campione sono state analizzate con esperimenti di Wester Blotting, con specifici anticorpi anti pAkt, pERK 1/2, pp38MAPK, pp60Src e β 3. Come mostrato in figura il 2-AG induce generalmente una maggiore fosforilazione rispetto al suo stereoisomero 1-AG (ad eccezione di pp60Src).

Le bande immunoreattive (figura 9) sono state analizzate con il software Quantità One. I risultati, riportati nei grafici sottostanti (figura 10), mostrano il diverso pattern di fosforilazione indotto da 1-AG (azzurro) e 2-AG (blu). La quantità di proteina fosforilata è stata normalizzata per la proteina totale presente nel campione (β 3). I risultati sono espressi come media di 2 differenti esperimenti. La fosforilazione di Erk1/2, p38MAPK e Akt è maggiore nei campioni stimolati con 2-AG rispetto a quelli stimolati con 1-AG. Nel caso di pSrc, invece, si nota una maggiore fosforilazione in presenza di 1-AG. I due stereoisomeri, quindi, nonostante siano in grado di indurre un'aggregazione simile, attivano vie di segnalazione diverse. Sembra inoltre che il 2-AG sia un agonista più forte rispetto al suo stereoisomero.

■ = 1-AG
 ■ = 2-AG

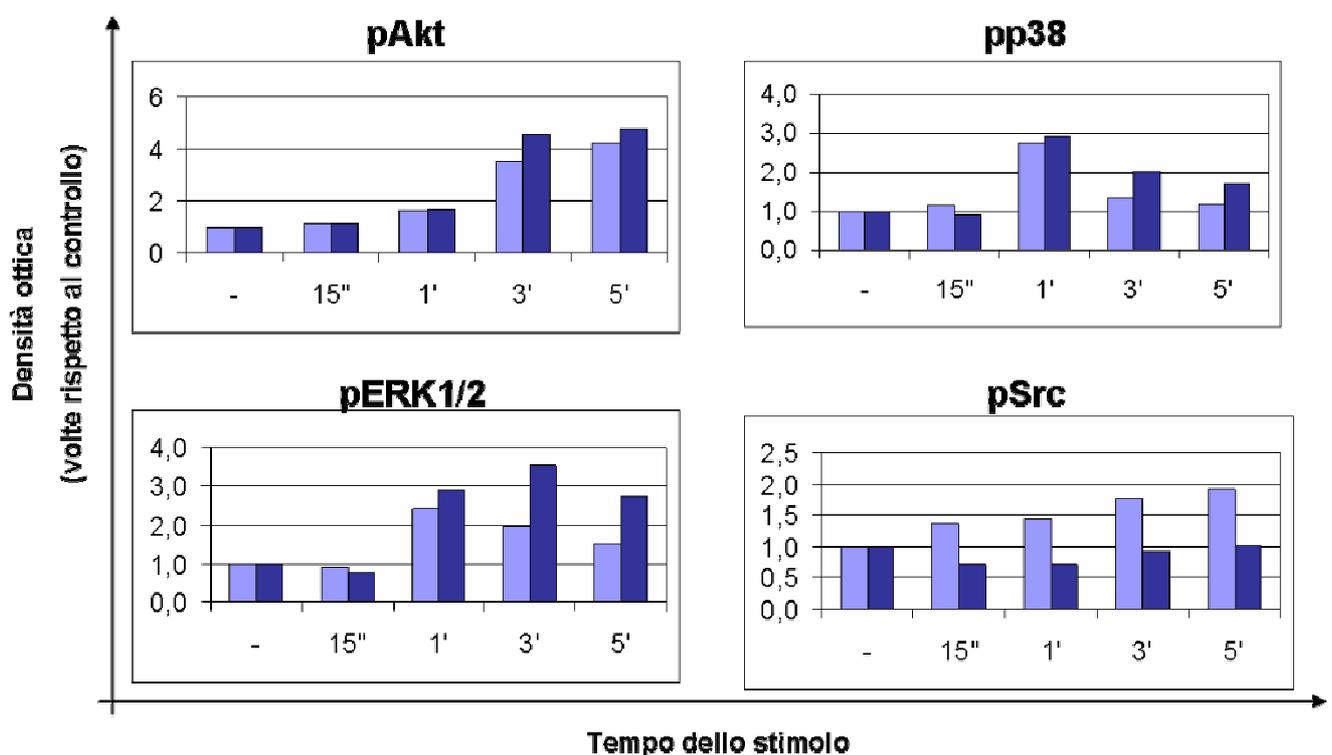


Figura 10. 2-AG E 1-AG INDUCONO DIVERSI PATTERN DI FOSFORILAZIONE PROTEICA: ANALISI DENSITOMETRICA. Le bande immunoreattive precedentemente ottenute (figura 9), sono state analizzate con il programma Quantity One per determinarne la densità. I valori sono stati normalizzati ponendo, per ogni proteina, il valore corrispondente al tempo zero uguale a 1.

JZL184, URB597 E CAY10404 INIBISCONO L'AGGREGAZIONE INDOTTA DA 1-AG

Le differenze osservate nel pattern di fosforilazione indotto da 1-AG e 2-AG ci hanno spinto ad approfondire come l'1-AG inducesse aggregazione piastrinica. Sapendo che, come nel caso del 2-AG, anche l'1-AG è substrato della MAGL, abbiamo ipotizzato che l'aggregazione potesse essere dovuta alla produzione di trombossanoA₂ derivato dal metabolismo dello stesso 1-AG. Per confermare questa ipotesi piastrine gel-filtrate sono state pretrattate 30' con 1 μ M JZL184 o rispettivo controllo (0,002% DMSO) e poi stimulate con 10 μ M 1-AG (figura 11). L'aggregazione indotta da 1-AG è fortemente inibita dal pretrattamento con JZL184, quindi molto probabilmente dovuta alla metabolizzazione dello stesso 1-AG.

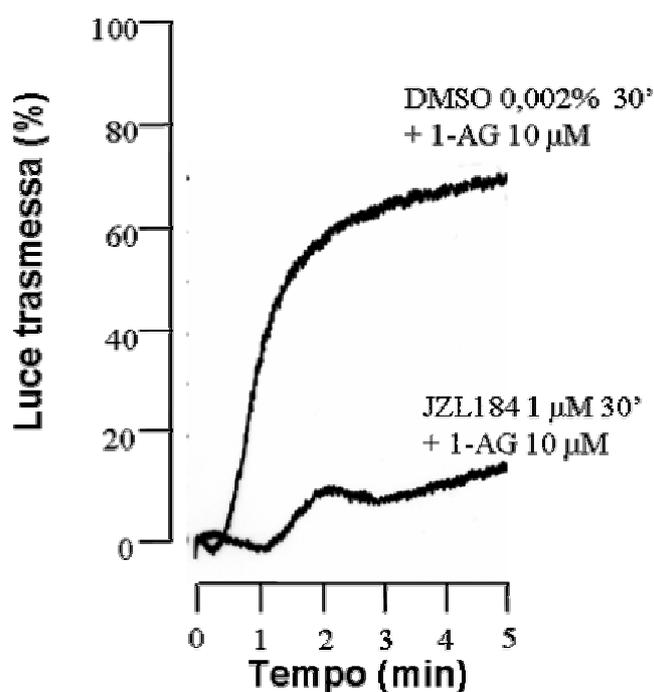


Figura 11: L'AGGREGAZIONE INDOTTA DA 1-AG E' FORTEMENTE INIBITA DA JZL184. Piastrine gel-filtrate sono state pretrattate con 1 μ M JZL184 o con 0,002%DMSO per 30' e poi stimulate con 10 μ M 1-AG. L'aggregazione è stata seguita per 5' dall'aggiunta dell'agonista. Il tracciato è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti. Il pretrattamento con l'inibitore della MAGL inibisce fortemente l'aggregazione indotta da 1-AG.

Dal tracciato in figura 11 si osserva che JZL184 inibisce in modo significativo la percentuale di aggregazione indotta da 1-AG ed aumenta il LAG time. Questi dati sono confermati dall'analisi statistica della percentuale d'aggregazione valutata a 5' dall'aggiunta dell'agonista (fig. 12A) e del LAG time (Fig. 12B).

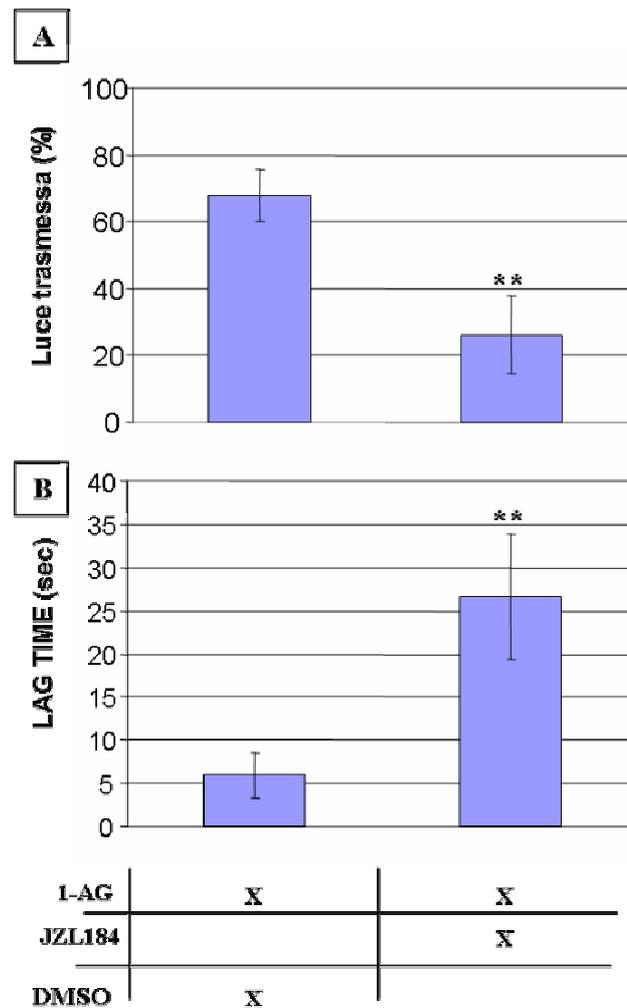


Figura 12. EFFETTI DELL'INIBITORE DELLA MAGL (JZL184) SULL'AGGREGAZIONE PIASTRINICA 1-AG DIPENDENTE. Analisi della percentuale di aggregazione (A) e del LAG time (B) di piastrine gel-filtrate pretrattate con 1 μ M JZL184 o 0,002% DMSO per 30' e poi stimulate con 10 μ M 1-AG. Come mostrato in figura (A), il pretrattamento con JZL184 riduce in modo significativo l'intensità dell'aggregazione indotta da 1-AG. Il pretrattamento con JZL184 inoltre aumenta in modo statisticamente significativo il LAG time (pannello B). I risultati sono espressi come la media \pm deviazione standard di 5 esperimenti; analisi statistica eseguita con t-Student (** $p < 0,01$).

I dati fin qui mostrati suggeriscono che l'aggregazione 1-AG-dipendente sia dovuta per la maggior parte alla sua stessa metabolizzazione ad opera della MAGL. Tuttavia i traccati mostravano un lieve fenomeno di aggregazione probabilmente dovuto all'azione di altri enzimi (come FAAH e COX-2). Tale ipotesi è stata confermata valutando, in aggregometria, l'effetto combinato degli inibitori della MAGL, FAAH e COX-2 (figura 13).

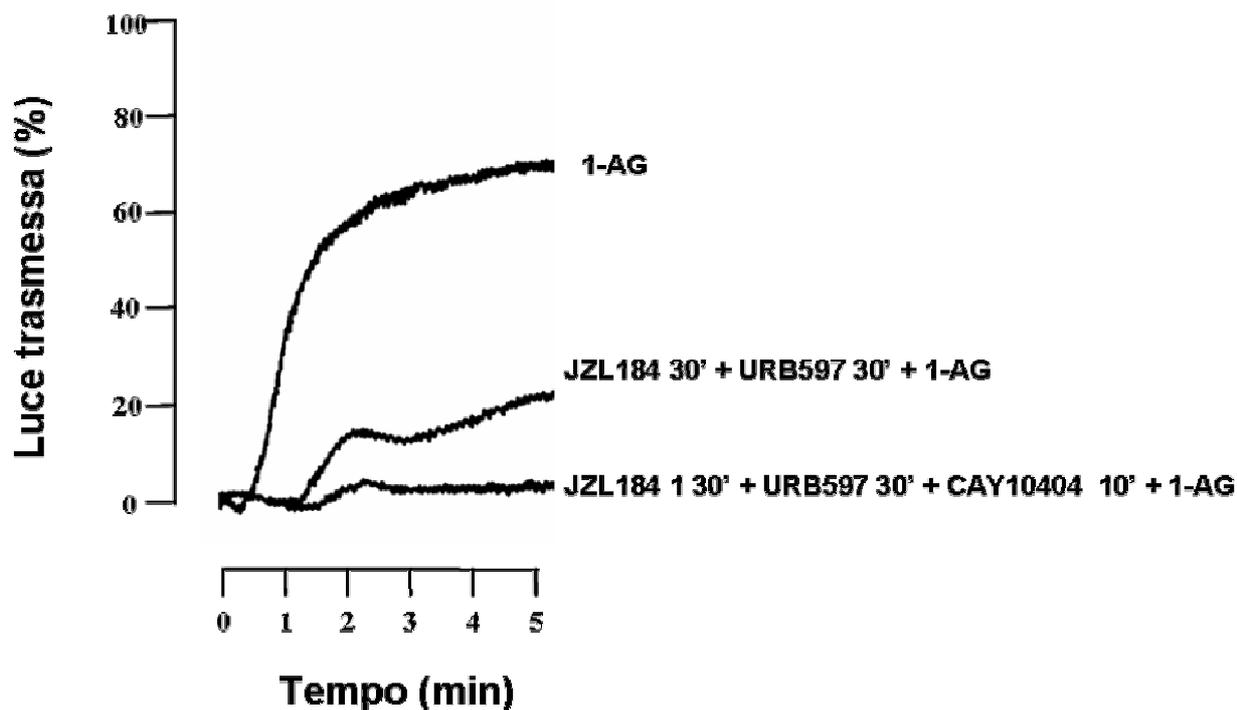


Figura 13. L'AZIONE COMBINATA DI CAY10404, URB597 E JZL184 INIBISCE COMPLETAMENTE L'AGGREGAZIONE INDOTTA DA 1-AG. Piastrine gel-filtrate sono state pretrattate con i soli 1 μ M URB597 e 1 μ M JZL184 per 30' o in combinazione con 1 μ M CAY10404 per 10' ed in seguito stimulate con 10 μ M 1-AG. L'aggregazione è stata seguita per 5'. Il grafico, rappresentativo di tre esperimenti indipendenti, mostra che l'azione combinata dagli inibitori blocca l'aggregazione indotta da 1-AG.

La presenza combinata di tutti e tre gli inibitori porta a completa inibizione dell'aggregazione indotta da 1-AG; questo dato conferma che l'aggregazione da 1-AG è completamente dipendente dalla metabolizzazione dello stesso 1-AG.

DISCUSSIONE

In letteratura è ampiamente dimostrato che il 2-AG è un agonista piastrinico in grado di indurre un'aggregazione dose-dipendente che è massima alla concentrazione di 10 μM (Baldassarri *et al.*, 2008). Nello stesso articolo gli autori dimostrano anche che l'aggregazione indotta da 2-AG è indipendente dal legame dell'endocannabinoide ai recettori CB1 e CB2, ma dipende dalla formazione di trombossanoA₂. Nelle piastrine il 2-AG può essere degradato da diversi enzimi (MAGL, FAAH e COX-2) ad acido arachidonico il quale, a sua volta, è velocemente convertito in trombossanoA₂ (potente agonista piastrinico). Per tale motivo abbiamo deciso di valutare quale fosse il ruolo di questo processo metabolico nei fenomeni di aggregazione 2-AG-dipendenti. Punto di partenza dei nostri studi è stato valutare il coinvolgimento della MAGL (principale enzima coinvolto nel metabolismo del 2-AG nel sistema nervoso): in piastrine pretrattate con il suo inibitore (JZL184) e poi stimulate con 2-AG, abbiamo osservato un ritardo nell'inizio dell'aggregazione (LAG time) (figura 2B), ma nessuna variazione significativa nella percentuale di aggregazione (Fig. 2A). Questi risultati preliminari suggerivano un importante ruolo degli altri enzimi coinvolti nel metabolismo del 2-AG. Attraverso ulteriori studi di aggregometria abbiamo però dimostrato che gli inibitori di MAGL, FAAH e COX-2 non inibiscono l'aggregazione piastrinica da 2-AG ma la ritardano solamente (figura 4). Anche gli studi di fosforilazione proteica mostrati in figura 5 hanno confermato che il principale effetto di JZL184 è causare un rallentamento dell'inizio dell'aggregazione 2-AG-dipendente.

La letteratura ampiamente riporta che il 2-AG può andare incontro ad isomerizzazione ad 1-arachidonoil-glicerolo (1-AG) il quale, a sua volta, può essere substrato della MAGL e portare a formazione di acido arachidonico. Dopo aver verificato che l'1-AG inducesse aggregazione dose-dipendente (figura 6A), abbiamo deciso di confrontare i tracciati di aggregazione indotta da 2-AG e 1-AG, entrambi alla concentrazione di 10 μM : nessuna sostanziale differenza è emersa né nella percentuale di aggregazione né nel LAG time (figura 7). Come accadeva per il suo stereoisomero, inoltre, l'aggregazione indotta da 1-AG è risultata essere dipendente dalla formazione di trombossanoA₂ (figura 8). Sono state evidenziate invece differenze nel pattern di fosforilazione indotto da 1-AG e 2-AG: seppur non vi siano sostanziali diversità nei tempi di attivazione delle proteine, il 2-AG sembra

essere un agonista più forte. Tali dati suggerivano quindi un diverso meccanismo nell'induzione dell'aggregazione piastrinica tra 1-AG e 2-AG. Per supportare ulteriormente questa teoria, abbiamo svolto studi di aggregazione in piastrine stimulate con 1-AG e pretrattate con JZL184. Nei campioni così trattati si osservava un'inibizione dell'aggregazione piastrinica, che risultava essere totalmente inibita in piastrine pretrattate anche con gli inibitori di FAAH e COX-2 (figura 13).

Alla luce di tutti i dati presentati possiamo concludere che la sola aggregazione indotta da 1-AG (e non da 2-AG) è completamente dipendente dal metabolismo del lipide. Il meccanismo con il quale il 2-AG induce aggregazione è infatti dovuto soltanto in piccola parte al suo metabolismo: l'inibizione degli enzimi coinvolti nella sua metabolizzazione provoca solo un aumento del LAG time. La formazione di acido arachidonico data dalla degradazione di 2-AG potrebbe secondo noi essere necessaria solo nella fase iniziale dell'aggregazione; quest'ultima potrebbe poi essere sostenuta da altre vie di attivazione (con tempi più tardivi). L'aumento del LAG time, che varia dai 23 ai 36 secondi, potrebbe corrispondere al tempo necessario al 2-AG per passare attraverso un trasportatore di membrana, non ancora conosciuto, o per la sua diffusione attraverso il doppio strato lipidico.

BIBLIOGRAFIA

- Authi KS. TRP channels in platelet function. *Handb Exp Pharmacol*. 2007; (179):425-43.
- Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Witte, L., Hicklin, D.J., Bohlen, P., Eaton, D., Lyden, D., de Sauvage, F. & Rafii, S. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature Medicine*. 2004; **10**, 64–71
- Baldassarri S, Bertoni A, Bagarotti A, Sarasso C, Zanfa M, Catani MV, Avigliano L, Maccarrone M, Torti M, Sinigaglia F. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB1/CB2 receptors. *J Thromb Haemost*. 2008; **6**(10):1772-9.
- Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell*. 1994; **77**(7):1117-24.
- Basavarajappa BS. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett*. 2007; **14**(3):237-46.
- Bátkai S, Pacher P. Endocannabinoids and cardiac contractile function: pathophysiological implications. *Pharmacol Res*. 2009; **60**(2):99-106. Review.
- Behnke O. An electron microscope study of megakaryocytes of rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J. Ultrastruct. Res*. 1968; **24**:412–433.
- Berdyshev EV, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH. Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells. *FASEB J*. 2001; **15**(12):2171-8.
- Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J*. 1997; **322**(Pt 2):671-7.
- Braud S, Bon C, Touqui L, Mounier C. Activation of rabbit blood platelets by anandamide through its cleavage into arachidonic acid. *FEBS Lett*. 2000; **471**(1):12-6.
- Broudy, V.C. & Kaushansky, K. Thrombopoietin, the c-mpl ligand, is a major regulator of platelet production. *Journal of Leukocyte Biology*. 1995; **57**:719–725.
- Bruno, S., Gunetti, M., Gammaitoni, L., Dane, A., Cavalloni, G., Sanavio, F., Fagioli, F., Aglietta, M. & Piacibello, W. In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex-vivo expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution. *Haematologica*. 2003; **88**:379–387.
- Caine, Y.G., Vlodaysky, I., Hersh, M., Polliack, A., Gurfel, D., Or, R., Levine, R.F. & Eldor, A. Adhesion, spreading and fragmentation of human megakaryocytes exposed to subendothelial extracellular matrix: a scanning electron microscopy study. *Scandinavian Electron Microscopy*. 1986; **3**:1087–1094.
- Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood*. 1995; **85**: 402–13.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996; **384**(6604):83-7.

- Croxford JL, Yamamura T. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J Neuroimmunol*. 2005; **66**(1-2):3-18. Review.
- 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.
- De Pergola G, Pannaciuoli N. Coagulation and fibrinolysis abnormalities in obesity. *J Endocrinol Invest*. 2002; **25**(10):899-904. Review.
- Deutsch, V.R., Olson, T.A., Nagler, A., Slavin, S., Levine, R.F. & Eldor, A. The response of cord blood megakaryocyte progenitors to IL-3, IL-6 and aplastic canine serum varies with gestational age. *British Journal of Haematology*. 1995; **89**: 8–16.
- Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol*. 2006; **134**(5):453-66.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988; **5**:605-13.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992; **258**(5090):1946-9.
- Di Marzo V. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta*. 1998-a; **1392**(2-3):153-75.
- Di Marzo V, Blumberg PM, Szallasi A. Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol*. 2002; **12**(4):372-9.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Sugiura T, Waku K. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; **227**(1):281-8.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994; **372**(6507):686-91.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*. 1998-b; **21**(12):521-8.
- Ebbe S, Stohlman F. Megakaryocytopoiesis in the rat. *Blood*. 1965; **26**:20–34.
- Ebbe S. Biology of megakaryocytes. *Prog. Hemost. Thromb*. 1976; **3**:211–229.
- Eldor, A., Levine, R.F., Caine, Y.G., HyAm, E. & Vlodaysky, I. Megakaryocyte interaction with the subendothelial extracellular matrix. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1986; **215**:399–404.
- Gandhi, M.J., Drachman, J.G., Reems, J.A., Thorning, D. & Lannutti, B.J. A novel strategy for generating platelet-like fragments from megakaryocytic cell lines and human progenitor cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2005; **35**:70–73.
- Gerrard J, White J, Rao G, Townsend D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am. J. Pathol*. 1976; **101**:353–364.
- Gewirtz, A.M. Megakaryocytopoiesis: the state of the art. *Thrombosis and Haemostasis*. 1995; **74**, 204–209.
- Godlewski G, Offertáler L, Wagner JA, Kunos G. Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2009; **89**(3-4):105-11.

- Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett.* 1998; **422**(1):69-73.
- Greco R, Gasperi V, Maccarrone M, Tassorelli C. The endocannabinoid system and migraine. *Exp Neurol.* 2010; **224**(1):85-91. Review.
- Han, Z.C., Bellucci, S. & Caen, J.P. Megakaryocytopoiesis: characterization and regulation in normal and pathologic states. *International Journal of Hematolog.* 1991; **54**:3-14.
- Handagama PJ, George M, Shuman R, McEver R, Bainton DF. Incorporation of circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987; **84**:861-865.
- Hartwig J, Italiano J Jr. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost.* 2003; **1**: 1580-6.
- Hébert TE, Bouvier M. Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem Cell Biol.* 1998; **76**(1):1-11.
- Henijnen HF, et al. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha granules. *Blood.* 1998;**91**:2313-2325.
- Hermann A, Kaczocha M, Deutsch DG. 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) membrane transport: history and outlook. *AAPS J.* 2006; **8**(2):E409-12.
- Horstman LL, Jy W, Ahn YS, Zivadinov R, Maghzi AH, Etemadifar M, Steven Alexander J, Minagar A. Role of platelets in neuroinflammation: a wide-angle perspective. *J Neuroinflammation.* 2010; **7**:10. Review.
- Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002; **68-69**:619-31.
- Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2003; **9**(1):61-7.
- Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell. Biol.* 1999; **147**: 1299-312.
- Ivanovic, Z., Duchez, P., Dazey, B., Hermitte, F., Lamrissi-Garcia, I., Mazurier, F., Praloran, V., Reiffers, J., Vezon, G. & Boiron, J.M. A clinical-scale expansion of mobilized CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells by use of a new serum-free medium. *Transfusion.* 2006; **46**:126-131.
- Jiang S, Fu Y, Williams J, Wood J, Pandarinathan L, Avraham S, Makriyannis A, Avraham S, Avraham HK. Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS ONE.* 2007; **2**(7):e641.
- Jordà MA, Lowenberg B, Delwel R. The peripheral cannabinoid receptor Cb2, a novel oncoprotein, induces a reversible block in neutrophilic differentiation. *Blood.* 2003; **101**(4):1336-43. Epub 2002 Oct 24.
- Jorda MA, Rayman N, Valk P, De Wee E, Delwel R. Identification, characterization, and function of a novel oncogene: the peripheral cannabinoid receptor Cb2. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; **996**:10-6.
- Jung J, Lee SY, Hwang SW, Cho H, Shin J, Kang YS, Kim S, Oh U. Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem.* 2002; **277**(46):44448-54. Epub 2002 Sep 11.
- Kaushansky, K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *New England Journal of Medicine.* 2006; **354**:2034-2045.

- Kaushansky K, Drachman JG. The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene*. 2002; **21**:3359–3367.
- Kaushansky, K The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005a; **115**:3339–3347.
- Kaushansky, K. Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003; **1**:1587–1592.
- Kaushansky, K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005b; **1044**:139–141.
- Kaushansky, K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*. 1995; **86**:419–431.
- Kile BT. The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. *J Thromb Haemost*. 2009; **1**:214-7
- Von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2007; **100**(1):27-40.
- Kirito K, Kaushansky K. Transcriptional regulation of megakaryopoiesis: thrombopoietin signaling and nuclear factors. *Curr Opin Hematol*. 2006; **13**(3):151-6.
- Kunos G, J arai Z, B atkai S, Goparaju SK, Ishac EJ, Liu J, Wang L, Wagner JA. Endocannabinoids as cardiovascular modulators. *Chem Phys Lipids*. 2000; **108**(1-2):159-68.
- Kunos G, Osei-Hyiaman D, B atkai S, Sharkey KA, Makriyannis A. Should peripheral CB(1) cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol Sci*. 2009; **30**(1):1-7. Review.
- Kuter, D.J., Gminski, D.M. & Rosenberg, R.D. Transforming growth factor beta inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood*. 1992; **7**:619–626
- Lannutti, B.J., Blake, N., Gandhi, M.J., Reems, J.A. & Drachman, J.G. Induction of polyploidization in leukemic cell lines and primary bone marrow by Src kinase inhibitor SU6656. *Blood*. 2005; **105**:3875–3878.
- Leoncini G, Signorello MG, Segantin A, Giacobbe E, Armani U, Piana A, Camicione P. In retinal vein occlusion platelet response to thrombin is increased. *Thromb Res*. 2009; **124**(6):e48-55.
- Levine RF. Isolation and characterization of normal human megakaryocytes. *Br J Haematol*. 1980; **45**(3):487-97.
- Lindemann S, Kr amer B, Seizer P, Gawaz M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2007 ; **5** Suppl 1:203-11.
- Lok S, Foster DC. The structure, biology and potential therapeutic applications of recombinant thrombopoietin. *Stem Cells*. 1994; **12** (6):586-98.
- Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pav on FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol*. 2009; **5**(1):37-44.
- Long M, Williams N, Ebbe S. Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor. *Blood*. 1982; **59**:569–575.
- Maccarrone M, Bari M, Del Principe D, Finazzi-Agr o A. Activation of human platelets by 2-arachidonoylglycerol is enhanced by serotonin. *Thromb Haemost*. 2003; **89**(2):340-7.

- Maccarrone M, Bari M, Menichelli A, Giuliani E, Del Principe D, Finazzi-Agrò A. Human platelets bind and degrade 2-arachidonoylglycerol, which activates these cells through a cannabinoid receptor. *Eur J Biochem.* 2001; **268**(3):819-25.
- Maccarrone M, Del Principe D, Finazzi-Agrò A. Endocannabinoids: new physiological (co-)agonists of human platelets. *Thromb Haemost.* 2002; **88**(1):165-6.
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; **91**(8):3171-80. Epub 2006 May 9.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995; **50**(1):83-90.
- Molina-Holgado F, Rubio-Araiz A, García-Ovejero D, Williams RJ, Moore JD, Arévalo-Martín A, Gómez-Torres O, Molina-Holgado E. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur J Neurosci.* 2007; **25**(3): 629-634.
- Mori, M., Tsuchiyama, J. & Okada, S. Proliferation, migration and platelet release by megakaryocytes in long-term bone marrow culture in collagen gel. *Cell Structure and Function.* 1993; **18**:409–417.
- Mukhopadhyay S, Shim JY, Assi AA, Norford D, Howlett AC. CB(1) cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling. *Chem Phys Lipids.* 2002; **121**(1-2):91-109.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993; **365**(6441):61-5.
- Nagata N, Muro Y, Todokoro K. Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J. Cell Biol.* 1997; **139**:449–457.
- Nakao K, Angrist A. Membrane surface specialization of blood platelet and megakaryocyte. *Nature.* 1968; **217**:960–961.
- Odell T, Jackson C, Friday T. Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy. *Blood.* 1970; **35**:775–782.
- Odell TT Jr, Jackson CW, Reiter RS. Generation cycle of rat megakaryocytes. *Exp. Cell Res.* 1968; **53**:321–328.
- Ogawa D. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1993; **81**:2844–2853.
- Pacher P, Mukhopadhyay P, Mohanraj R, Godlewski G, Bátkai S, Kunos G. Modulation of the endocannabinoid system in cardiovascular disease: therapeutic potential and limitations. *Hypertension.* 2008; **52**(4):601-7.
- Patel, S.R., Hartwig, J.H. & Italiano, J.E. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *Journal of Clinical Investigation.* 2005; **115**:3348–3354.
- Pertwee, R.G., Ross, R.A. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; **66**:101-21.
- Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2003; **4**(11):873-84.
- Prescott SM, Majerus PW. Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *J Biol Chem.* 1983; **258**(2):764-9.

- Radley JM, Scurfield G. The mechanism of platelet release. *Blood*. 1980; **56**: 996–9.
- Randall MD. Endocannabinoids and the haematological system. *Br J Pharmacol*. 2007; **152**(5):671-5.
- Ravid K, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J. Cell. Physiol*. 2002; **190**:7–20.
- Schulze H, Shivdasani RA. Molecular mechanisms of megakaryocyte differentiation. *Semin Thromb Hemost*. 2004; **30**(4):389-98.
- Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. *J. Thromb Hemost*. 2005; **3**:1717-1724.
- Sohma Y, Akahori H, Seki N, Hori T, Ogami K, Kato T, Shimada Y, Kawamura K, Miyazaki H. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett*. 1994; **353**(1):57-61.
- Steinhuibl SR. Platelets as mediators of inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007; **21**(1):115-21.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 1997; **388** (6644):773-8.
- Straiker A, Hu SS, Long JZ, Arnold A, Wager-Miller J, Cravatt BF, Mackie K. Monoacylglycerol lipase limits the duration of endocannabinoid-mediated depolarization-induced suppression of excitation in autaptic hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*. 2009; **76**(6):1220-7.
- Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Kishimoto S, Kondo S, Waku K. Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonoylglycerol, and cannabinoid CB1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonoylglycerol a possible vasomodulator? *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; **243**(3):838-43.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; **215**(1):89-97.
- Sugiura T, Oka S, Gokoh M, Kishimoto S, Waku K. New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: 2-arachidonoylglycerol as a possible novel mediator of inflammation. *J Pharmacol Sci*. 2004; **96**(4):367-75.
- Sunita R. Patel, John H. Hartwig, and Joseph E. Italiano, The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets *Jr. Clin Invest*. 2005; **115**(12): 3348–3354.
- Tomer, A., Harker, L.A. & Burstein, S.A. Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. *Blood*, 1988; **71**:1244–1252.
- Tomer, A., Harker, L.A. & Burstein, S.A. Purification of human megakaryocytes by fluorescence-activated cell sorting. *Blood*. 1987; **70**, 1735–1742.
- Valk P, Verbakel S, Vankan Y, Hol S, Mancham S, Ploemacher R, Mayen A, Löwenberg B, Delwel R. Anandamide, a natural ligand for the peripheral cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for hematopoietic cells. *Blood*. 1997; **90**(4):1448-57.
- Xie XQ, Chen JZ, Billings EM. 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins*. 2003; **53**(2):307-19.
- Yamada F. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat. (Basel)*. 1957; **29**:267–290.

Zauli, G. & Catani, L. Human megakaryocyte biology and pathophysiology. *Critical Reviews in Oncology/hematology*. 1995; **21**:135–157.

Ziegelstein RC, Parakh K, Sakhuja A, Bhat U. Platelet function in patients with major depression. *Intern Med J*. 2009; **39**(1):38-43.

Zucker-Franklin, D. & Petursson, S. Thrombocytopoiesis – Analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megakaryocytes. *Journal of Cell Biology*. 1984; **99**:390–402.

ATTIVITA' FORMATIVA

SEMINARI FREQUENTATI NEL CORSO DEL TERZO ANNO DI DOTTORATO:

4 novembre 2009

Dott. E. Ongini

“Naproxinod, un nuovo anti-infiammatorio con elevata tollerabilità cardiovascolare”

17 novembre 2009

Prof. G. Inghirami

“ALK e tumorigenesi”

30 novembre 2009

Prof. N. Mermoud

“Use of MAR epigenetic regulators for therapeutic expression”

14 dicembre 2009

Dott. F. Grassi

“Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare”

14 gennaio 2010

Prof. P. Invernizzi

“Clinical significance of Antinuclear Antibodies in Autoimmune liver disease”

20 gennaio 2010

Dott. E. Battaglioli

“LSD1, Lysine Specific Demethylase1: insight into a new epigenetic regulator involved in neuronal gene regulation”

21 gennaio 2010

Prof. G. Alessandri

“Cellule mesenchimali stromali fetali ed adulte: potenziali applicazioni in patologie ischemiche”

28 gennaio 2010

Prof. L. Maiuri

“Dal difetto genetico all’infiammazione”

9 febbraio 2010

Dott. G. Baldi

“R & D of magnetic-nanoparticles and carriers for drugs”

11 febbraio 2010

Prof. A. Garzino-Demo

“A novel antiviral mechanism mediated by the chemokine receptor CCR6”

17 febbraio 2010

Prof. S. Pieraccini

"Computational analysis of protein-protein interactions"

18 febbraio 2010

Dott. S. Carda

"Il recupero del cammino dopo lo stroke, mediante utilizzo di mezzi robotici, farmacologici e chirurgici"

3 marzo 2010

Prof. F. Cucca

"Basi genetiche del diabete di tipo 1 e della sclerosi multipla: l'esempio della popolazione sarda"

4 marzo 2010

Prof. A. Azzi

"I virus dell'influenza: aspetti patogenetici, epidemiologici e preventivi"

5 marzo 2010

Prof. S. Ellis

"The Wonders of Yeast: Yeast as a Model Organism"

8 marzo 2010

Prof. S. Ellis

"Chromosome 5q deletions in MDS: Genotype/Phenotype Relationships"

9 marzo 2010

Prof. S. Ellis

"Dasatinib: Transforming an adverse event into a new therapeutic target"

12 marzo 2010

Prof. E. Scarpini

"Marcatori biologici per la diagnosi precoce delle malattie neurodegenerative"

19 marzo 2010

Dott. A. Silvani

"Linfomi primitivi cerebrali: diagnosi e trattamento"

1 aprile 2010

Dott. E. Franchi

"Lo studio invasivo della rigidità aortica nell'uomo"

29 aprile 2010

Dott.ssa F. Prodham

"Alterazioni endocrino-metaboliche in età pediatrica: prevalenza della sindrome metabolica e regolazione del sistema ghrelinergico"

6 maggio 2010

Dott. J. Doorbar

"The Molecular Biology of Human Papillomavirus Infection and Disease"

10 maggio 2010

Prof. B. F. Sloane

"4D Imaging of Tumor Proteolysis: Impact of microenvironment"

13 maggio 2010

Dott. S. Rasi

"L'impatto del background genetico dell'ospite sulla prognosi nelle neoplasie linfoidi B"

20 maggio 2010

Prof. D. Ferone

"Aspetti endocrino-metabolici in transessuali (trans gender): modello fisiopatologico innovativo?"

26 maggio 2010

Dott. H. Tafer

"Prediction of RNA-RNA interaction"

27 maggio 2010

Dott. V. R. Spina

"Meccanismi molecolari associati a trasformazione da leucemia linfatica cronica a linfoma aggressivo"

3 giugno 2010

Dott. A. Cerutti

"Role of Nuclear Exportation Sequences (NES) in the sub-cellular localization of HCV Core Protein"

4 giugno 2010

Prof. M. Senna

"Functional nanocomposite for pharmaceutical application from physicochemical viewpoints"

14 giugno 2010

Prof. D. Schiffer

"Fenotipo e cellule staminali tumorali nei gliomi maligni"

15 giugno 2010

Prof. C. Ponzetto

"Nuove strategie anticancro: i microRNA come agenti differenziativi per i tumori solidi"

17 giugno 2010

Dott. S. Deaglio

"Human CD38: a long journey from prognostic marker to key element in the pathogenesis, maintenance and progression of chronic lymphocytic leukaemia"

17 giugno 2010

Dott. S. Ellis

"Combating Bioterrorism: New Antidotes for an Old Poison"

21 giugno 2010

Dott. A. Marzano

"Infezione cronica da virus B conclamata ed occulta: diagnosi ed implicazioni cliniche"

28 giugno 2010

Prof. P. Zamboni

"Insufficienza Venosa Cerebrospinale Cronica: una nuova prospettiva per la Sclerosi Multipla?"

28 giugno 2010

Prof. F. Fagioli

"Le cellule staminali mesenchimali: potenziale terapeutico nelle malattie del motoneurone e della mielina"

30 giugno 2010

Prof. F. Novelli

"Identificazione di antigeni per la diagnosi e la terapia del carcinoma pancreatico mediante l'analisi sierologica del proteoma"

5 luglio 2010

Dott. P. Camoletto

"Role of membrane lipids in neuronal synapses organization"

6 luglio 2010

Dott. D. Fortunati

"Tissue Transglutaminase, a polyhedric enzyme: friend or foe?"

8 luglio 2010

Dott. F. Uberti

"Vie di signalling implicate nella vasodilatazione mediata da Urocortina II"

22 Settembre 2010

Prof. Kenji YAMAMOTO

"New aspects of Cathepsin E functions in host defense mechanisms"

22 Settembre 2010

Dr. Ruggero DE MARIA

"Le cellule staminali tumorali: dalla biologia alla clinica"

23 Settembre 2010

Dr. Steven R. ELLIS

"Preventing Persisters: Targeting Epigenetic Changes in Cancer Chemotherapy"

24 Settembre 2010

Dr. John SHACKA

"Low-dose Bafilomycin is cytoprotective against Lysosomedysfunction, Implication of an Autophagy-associated therapeutic target for Neurodegenerative disease"

24 Settembre 2010

Prof. Laura SANTAMBROGIO

"A self-antigen peptidome carried by the human lympho"

SEZIONE 2

CONGRESSI FREQUENTATI:

Terzo anno di dottorato :

Congresso: 23a RIUNIONE NAZIONALE "A. Castellani" DEI DOTTORANDI DI RICERCA IN DISCIPLINE BIOCHIMICHE"

Sede: Brallo di Pregola

Data: 7-11 giugno 2010

Congresso: "NOTTINGHAM PLATELET CONFERENCE"

Sede: Nottingham

Data: 15-16 luglio 2010

Congresso: "55th NATIONAL MEETING OF THE ITALIAN SOCIETY OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (SIB)"

Sede: Milano

Data: 14-17 settembre 2010

COMUNICAZIONI A CONGRESSI:

- Terzo anno di dottorato :

Congresso: X riunione Gruppo di Studio delle Piastrine

Sede: Termoli

Data: 4-6 ottobre 2009

Titolo: "Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits thrombin-induced platelet aggregation"

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

Congresso: Convegno annuale della sezione ligure-lombardo-piemontese della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare (LLP 2010)

Sede: Varese

Data: 28 maggio 2010

Titolo: "Preliminary analysis of R59022-Diacylglycerol Kinases inhibition during Megakaryocytopoiesis"

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

Congresso: 23a Riunione Nazionale "A. Castellani" dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche -

Sede: Brallo di Pregola (Pavia)

Data: 7-11 giugno 2010

Titolo: "Preliminary analysis of R59022-Diacylglycerol Kinases inhibition during Megakaryocytopoiesis"

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

Congresso: 23a Riunione Nazionale "A. Castellani" dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche -

Sede: Brallo di Pregola (Pavia)

Data: 7-11 giugno 2010

Titolo: "Inhibition of Thrombin induced platelet aggregation by Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone-Sulfate"

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

Congresso: 23a Riunione Nazionale "A. Castellani" dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche -

Sede: Brallo di Pregola (Pavia)

Data: 7-11 giugno 2010

Titolo: "Inhibition of collagen-dependent platelet aggregation by 8-prenylnaringenin"

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

Congresso: Nottingham Platelet Conference

Data: 15-16 luglio 2010

Titolo: "Inhibition of collagen-dependent platelet aggregation by 8-prenylnaringenin"

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

Congresso: Nottingham Platelet Conference

Data: 15-16 luglio 2010

Titolo: "Effect of Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone-Sulfate on platelet function"

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

Congresso: 55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Data: 14-17 luglio 2010

Titolo: "Preliminary analysis of R59022-Diacylglycerol Kinases inhibition during Megakaryocytopoiesis"

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

Congresso: 55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Data: 14-17 luglio 2010

Titolo: "Effects of 8-prenylnaringenin on human platelets activation and aggregation"

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

Congresso: 55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Data: 14-17 luglio 2010

Titolo: "Role of 2-AG catabolism on platelet aggregation"

Autori: S. Saragozza, **A. Bagarotti**, S. Sampietro, C. Di Vito, A. Rastoldo, F. Sinigaglia, A. Bertoni (poster)

Congresso: 55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Data: 14-17 luglio 2010

Titolo: "Endocannabinoids and murine Megakaryocytic differentiation"

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

Congresso: 55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Data: 14-17 luglio 2010

Titolo: "Modulation of platelet functionality by Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone-Sulfate"

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

COMUNICAZIONI A CONGRESSI: presentazioni orali

Congresso: 23a Riunione Nazionale "A. Castellani" dei Dottorandi di Ricerca in Discipline Biochimiche -
Sede: Brallo di Pregola (Pavia)

Data: 7-11 giugno 2010

Titolo: "MODULATION OF MURINE MEGAKARYOCYTIC DIFFERENTIATION BY
ENDOCANNABINOIDS"

A. Bagarotti (presentazione orale)

Congresso: 55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

Data: 14-17 luglio 2010

Titolo: "ENDOCANNABINOIDS AND MURINE MEGAKARYOCYTIC DIFFERENTIATION"

A. Bagarotti (presentazione orale)

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO:

Baldassarri S, Bertoni A, **Bagarotti A**, Sarasso C, Zanfa M, Catani MV, Avigliano L, Maccarrone M, Torti M, Sinigaglia F.

The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB1/CB2 receptors.

J Thromb Haemost. 2008 Oct; 6(10):1772-9

Di Vito C, Bergante S, Balduini A, Rastoldo A, **Bagarotti A**, Surico N, Bertoni A, Sinigaglia F.

The oestrogen receptor GPER is expressed in human haematopoietic stem cells but not in mature megakaryocytes.

Br J Haematol 2010 Apr;149(1):150-2.
