

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



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare**

Ciclo XXVI

Relazione 2° anno

TITOLO:

**Ruolo degli endocannabinoidi nel differenziamento
megacariocitario**

Candidato: Nalin Michela

***Tutor:* Prof. Sinigaglia Fabiola**

<u>INDICE</u>	2
<u>SEZIONE 1-RISULTATI SCIENTIFICI</u>	4
<u>1.INTRODUZIONE</u>	4
<u>1.1 La Megacariopoiesi</u>	4
<u>1.2 Regolazione della megacariopoiesi</u>	6
<u>1.3 Produzione e rilascio delle piastrine</u>	9
<u>1.4 Gli Endocannabinoidi</u>	11
<u>1.5 ENDOCANNABINOIDI: SINTESI E DEGRADAZIONE</u>	12
<u>1.6 Endocannabinoidi: i recettori</u>	14
<u>2. SCOPO DEL LAVORO</u>	17
<u>3.MATERIALI E METODI</u>	19
<u>3.1 Isolamento di cellule staminali ematopoietiche murine</u>	19
<u>3.2 Preparazione dei lisati cellulari totali e analisi proteica</u>	19
<u>3.3 Analisi dell'espressione genica di CB1 e CB2 mediante Real Time-PCR</u>	20
<u>3.4 Endocannabinoidi e differenziamento cellulare</u>	20
<u>3.5 Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: poliploidizzazione-citofluorimetria a flusso</u>	21
<u>3.6 Endocannabinoidi e MEG-01: aumento delle dimensioni cellulari</u>	21
<u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	22
<u>4. RISULTATI</u>	22
<u>Espressione di CB1 e CB2: analisi mediante immunoblotting</u>	21
<u>Real Time- PCR</u>	23
<u>Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: citofluorimetria a flusso</u>	24
<u>Endocannabinoidi e MEG-01</u>	28
<u>5. DISCUSSIONE</u>	31
<u>6. BIBLIOGRAFIA</u>	34
<u>ATTIVITA' FORMATIVA:</u>	40

<u>SEZIONE 2:</u>	43
<u>PARTECIPAZIONI A CONGRESSI:</u>	43
<u>COMUNICAZIONI A CONGRESSI:</u>	43
<u>ARTICOLI SCIENTIFICI PRODOTTI NEL CORSO DEL DOTTORATO:</u>	44

SEZIONE 1- RISULTATI SCIENTIFICI

1. INTRODUZIONE

1.1 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).

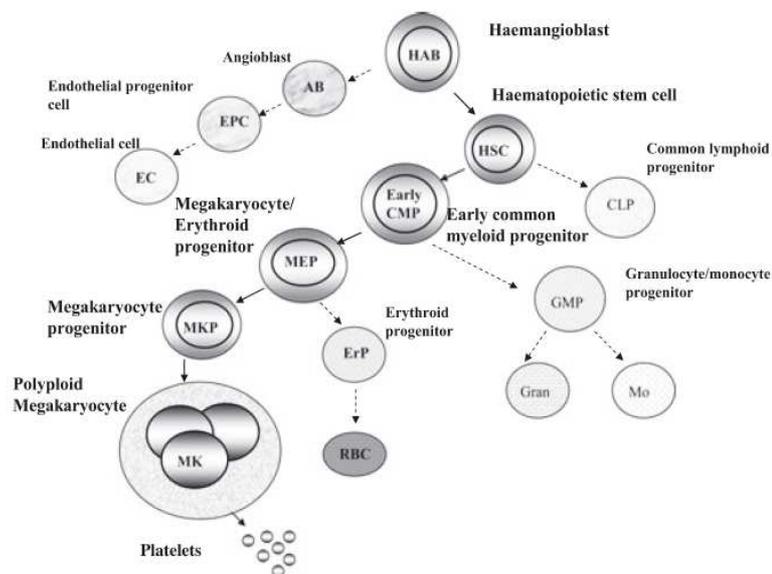


Figura 1 SCHEMA DEL DIFFERENZIAMENTO EMATOPOIETICO: Lo sviluppo delle cellule del sangue procede da una cellula staminale ematopoietica (HSC), che può replicarsi o differenziare in cellule progenitrici di varie filiere: un progenitore linfocitario comune (CLP) o un progenitore mieloide comune (CMP).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

I megacariociti, per poter sintetizzare le piastrine, modificano 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 propiastri. 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.

1.2 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).

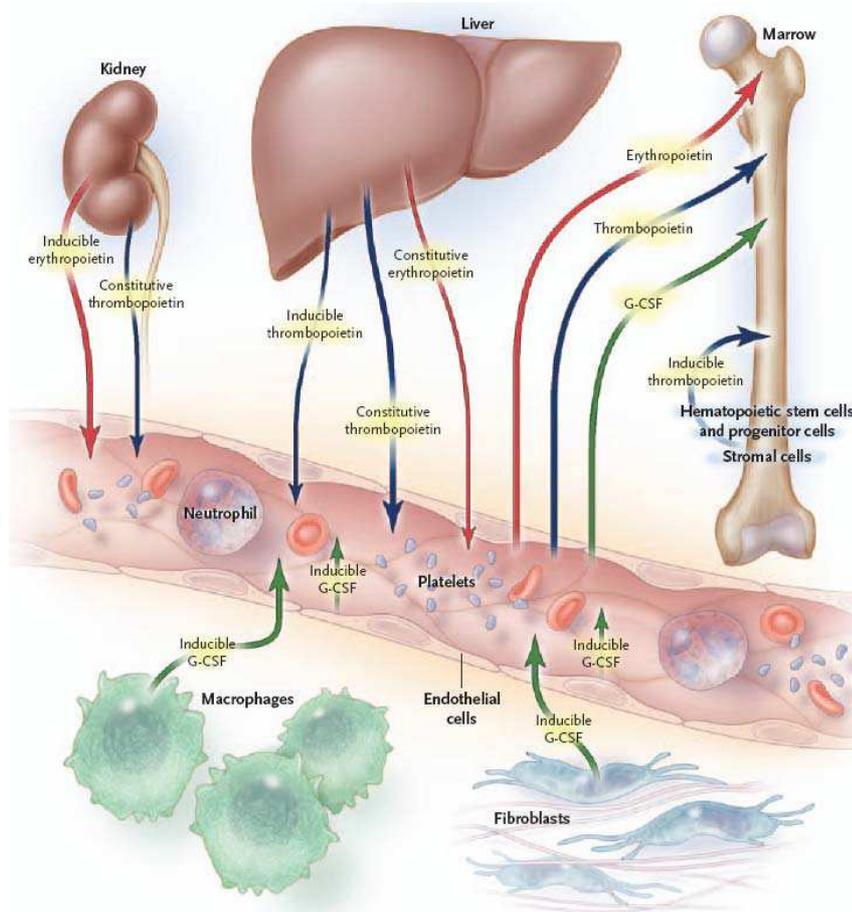


Figura 2 PRODUZIONE DEI FATTORI DI CRESCITA EMATOPOIETICI: la produzione di fattori di crescita dai vari tessuti e cellule (freccie) è sia costitutiva che inducibile ed è soggetta al consumo periferico. Il G-CSF (freccie verdi) è soprattutto inducibile in tessuti dai fibroblasti e macrofagi e da cellule 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 propiastri (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).

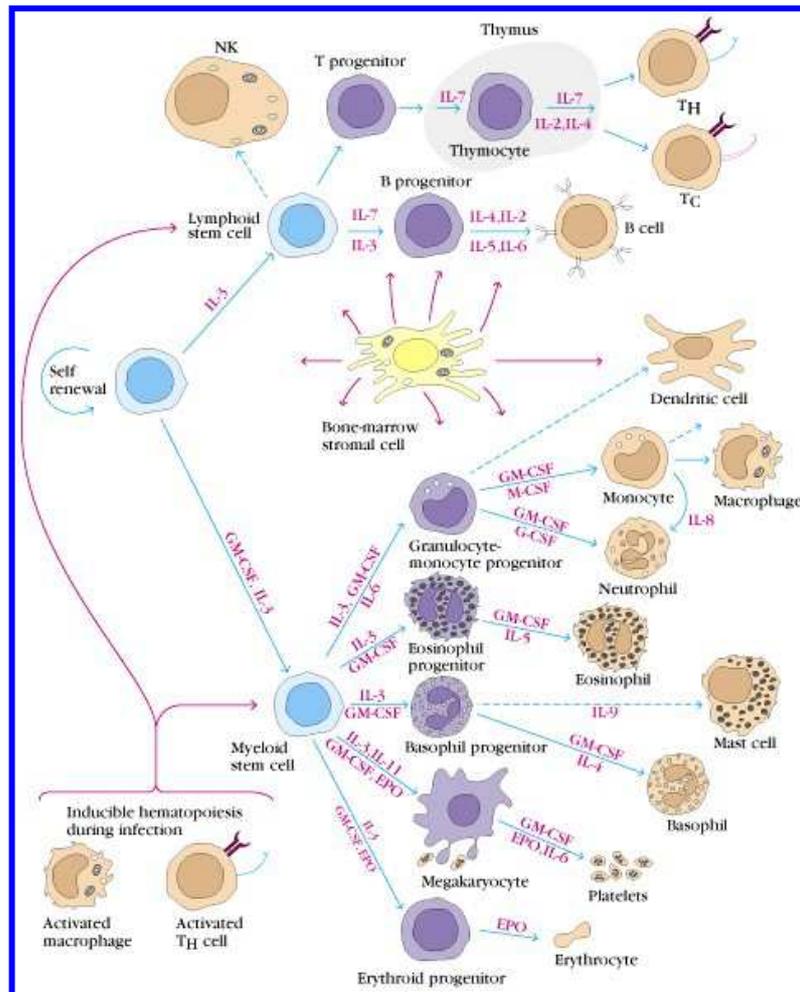


Figura 3 FATTORI COINVOLTI NEL DIFFERENZIAMENTO EMATOPOIETICO: Lo sviluppo di differenti tipi cellulari a partire dalla cellula staminale mieloide, richiede l'azione combinata di più citochine e fattori di crescita. La produzione di piastrine, in particolare, è regolata da trombopoietina (TPO), eritropoietina (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*).

1.3 PRODUZIONE E RILASCIO DELLE PIASTRINE

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

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

Attualmente esistono due modelli di trombopoiesi, che non necessariamente sono mutuamente esclusivi (Deutsch and Tomer 2006). Secondo il primo modello i megacariociti maturi, quando coltivati in contatto con matrice extracellulare del sottoendotelio, sono stimolati a produrre piastrine con una frammentazione esplosiva dell'intero citoplasma (Caine *et al.*, 1986). Questa teoria, che ad oggi sembra essere sorpassata, era stata confermata da studi di microscopia a contrasto di fase *in vivo* ed *in vitro* (Caine *et al.*, 1986; Eldor *et al.*, 1986). Il secondo modello, 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 propiastri: la loro formazione è accompagnata da un alternarsi di fenomeni quali estensione, retrazione, ricurvamenti e ramificazioni; queste ultime in particolare (Italiano *et al.*, 1999), rappresenterebbero un elegante meccanismo per amplificare il numero delle estremità produttive. Sempre secondo questa teoria i megacariociti maturi, indotti dal fattore chemotattico SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) e in presenza di FGF-4 (fibroblast growth factor-4), migrerebbero dalla nicchia midollare verso le cellule endoteliali dei sinusoidi. Le propiastri si comporterebbero quindi da

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

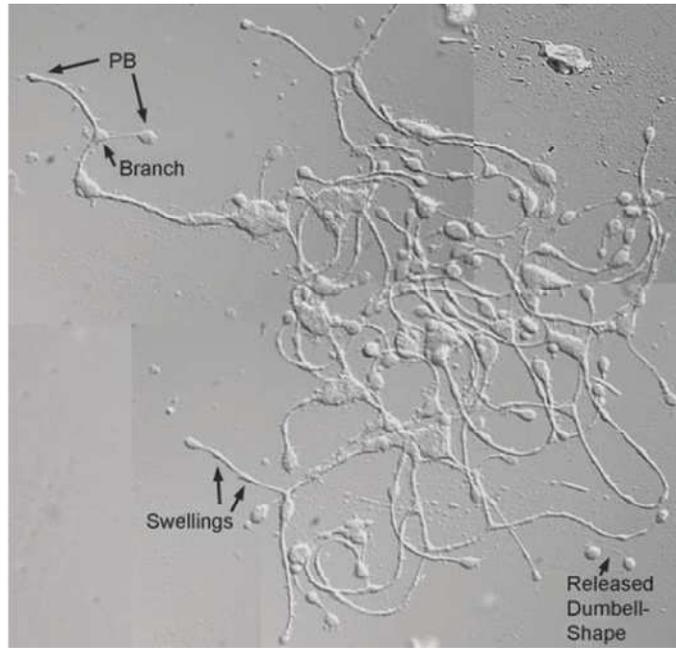


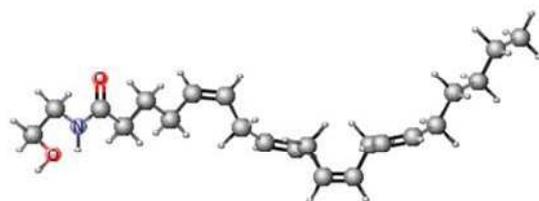
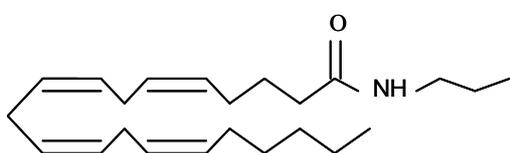
Figura 4 FORMAZIONE DI PROPIASTRINE: nell'arco di poche ore, il citoplasma del megacariocita viene convertito in protrusioni filamentari chiamate propiastri. Dall'immagine è possibile osservare lungo le estroflessioni la presenza di rigonfiamenti (che conferiscono alla propiastrina l'aspetto di una collana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

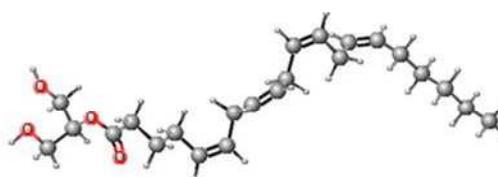
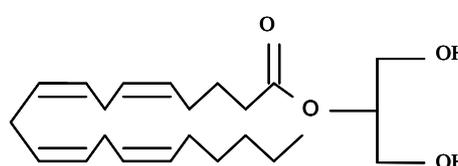
1.4 GLI ENDOCANNABINOIDI

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.

ANANDAMIDE



2-ARACHIDONOILGLICEROLO



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

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

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

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

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

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

In particolare l'idrolisi dell'anandamide (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.

1.6 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).

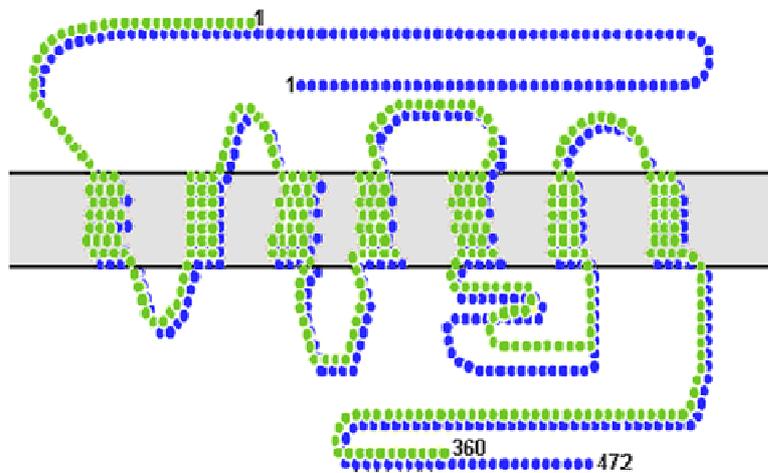


Figura 5 Struttura dei recettori CB1 (blu) e CB2 (verde)

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).

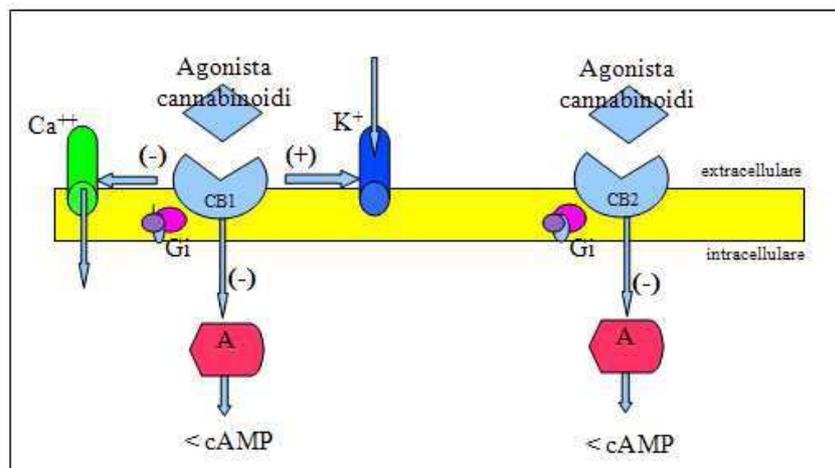


Figura 6 Vie di trasduzione del segnale attivate dagli agonisti dei cannabinoidi

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*).

2. 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 recenti pubblicati in letteratura mostrano 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*).

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

Dalla letteratura è noto che 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 piastrine 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 piastrine e globuli rossi.

Recentemente è stato dimostrato che cellule ematopoietiche staminali embrionali di topo non solo esprimono i recettori CB1 e CB2 ma sono anche in grado di sintetizzare endocannabinoidi. L'aggiunta di cannabinoidi esogeni aumenta la formazione dei corpi embrioidi 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 embrioidi 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.

In questo contesto si inserisce il mio lavoro, che nasce 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. A questo scopo le cellule staminali ematopoietiche murine sono state differenziate in vitro in presenza di opportuno cocktail di citochine e il differenziamento è stato valutato in base all'aumento delle dimensioni. La presenza dei vari recettori per gli endocannabinoidi è stata valutata sia come trascritto tramite RT-PCR, sia come proteina, in esperimenti di Western Blotting.

In parallelo ho anche avviato lo studio sulla presenza del sistema endocannabinoide in cellule MEG-01, linea megacarioblastica umana differenziabile con PMA verso la linea megacariocitaria e in grado di generare spontaneamente proplatelets.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Isolamento di cellule staminali ematopoietiche murine

Cellule del midollo osseo sono state prelevate dalle tibie e dai femori di topi C57Bl/6 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 ulteriormente selezionate al fine di ottenere una popolazione Lin⁻/cKit⁺ (Miltenyi) e coltivate ad una densità iniziale di 1×10^6 /mL in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) con aggiunta di 20 ng/ml di SCF per 48 ore; successivamente vengono messe in presenza di 100 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 corrispondono alle cellule poste in coltura con SCF per 48 ore senza l'aggiunta della TPO, raccolte e 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).

3.2 Preparazione di lisati cellulari totali e analisi proteica

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

Blotting su membrana PVDF (polivinildene di fluoruro) e marcate con anticorpi anti-CB1, anti-CB2 e anti- TRPV-1.

3.3 Analisi dell'espressione genica di CB1 e CB2 mediante real time -PCR

L'RNA presente nelle cellule ai diversi giorni del differenziamento, è stato estratto utilizzando il reagente Trizol (Ambion), seguendo le istruzioni indicate dalla ditta produttrice; dopo l'estrazione l'RNA è stato precipitato e successivamente risospeso in acqua RNase free (Sigma). Dopo aver quantificato l'RNA così ottenuto (Nanodrop ND1000 Spectrophotometer), il campione è stato purificato da eventuali contaminazioni genomiche e retrotrascritto in cDNA, utilizzando l'apposito kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). Per la real-time PCR la reazione è stata eseguita in un volume finale di 20 μ L contenenti: sonda TaqMan 250 nM e primers 900 nM specifici per il trascritto (Applied Biosystem), 2 μ L 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).

3.4 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), AM630 (inibitore selettivo di CB2) e OMDM1 (inibitore della ricaptazione dell'anandamide) (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".

3.5 Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: poliploidizzazione – citofluorimetria a flusso

Cellule raccolte al giorno 0 sono state differenziate in presenza di 10 μM MetAEA sola o aggiunta di 1 μM AM251 (antagonista selettivo di CB1 – recettore preferenziale dell'AEA per la sua attività biologica) AM630 e OMDM1 e differenziate. I campioni raccolti e pellettati ai giorni 0, 3 e 5 del differenziamento come precedentemente descritto sono stati delicatamente risospesi in 130 μL di PBS e poi aggiunti goccia a goccia di 1170 μL 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 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di propidio ioduro ed RNasi (0,2 mg/mL). Il materiale così preparato è stato acquisito con citofluorimetro FACScalibur ed analizzato con il software CellQuest (Becton Dickinson).

3.6 Endocannabinoidi e MEG-01: aumento delle dimensioni cellulari

Cellule MEG-01, linea megacarioblastica umana, vengono poste in coltura ad una densità iniziale di 5×10^6 cellule/mL in terreno RPMI arricchito di 10% siero e aggiunto, dove necessario, di 10 μM Metanandamide (MetAEA) sola, 10 μM 2-arachidonoilglicerolo, 100 nM PMA e MetAEA in presenza di PMA nello stesso pozzetto .

Negli esperimenti di citofluorimetria a flusso, i campioni raccolti e pellettati ai giorni 1, 3, 5 e 7 del differenziamento stati delicatamente risospesi in 130 μL di PBS e poi aggiunti goccia a goccia di 1170 μL di Et-OH 70% freddo. Le cellule sono quindi state centrifugate 5', 200xg, temperatura ambiente e successivamente lavate in PBS. I campioni sono infine stati lentamente risospesi e poi incubati 30' al buio, in una soluzione contenente 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di propidio ioduro ed RNasi (0,2 mg/mL). Il materiale così preparato è stato acquisito con citofluorimetro FACScalibur ed analizzato con il software CellQuest (Becton Dickinson).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Espressione di CB1 e CB2: analisi mediante Immunoblotting

Per valutare la presenza dei recettori degli endocannabinoidi CB1 e CB2, lisati di megacariociti murini sono stati analizzati mediante Immunoblotting. Per questo motivo, cellule staminali ematopoietiche murine sono state isolate come descritto, e indotte al differenziamento megacariocitico. Al quinto giorno dall'induzione del differenziamento, grazie al significativo aumento di dimensioni, i megacariociti maturi sono stati separati dal resto della popolazione cellulare tramite sedimentazione. L'immunocolorazione è stata eseguita con specifici anticorpi commerciali: anti-CB1 e anti-CB2 e anti-TRPV1 (Cayman chemical).

Come è possibile vedere nell'immagine solo i livelli dei recettori CB1 e TRPV1 (recettore vanilloide di tipo 1, a cui l'anandamide si lega e che può essere considerata quindi un vero e proprio "endovanilloide") aumentano durante il processo differenziativo mentre rimangono invariati i livelli di espressione del recettore CB2.

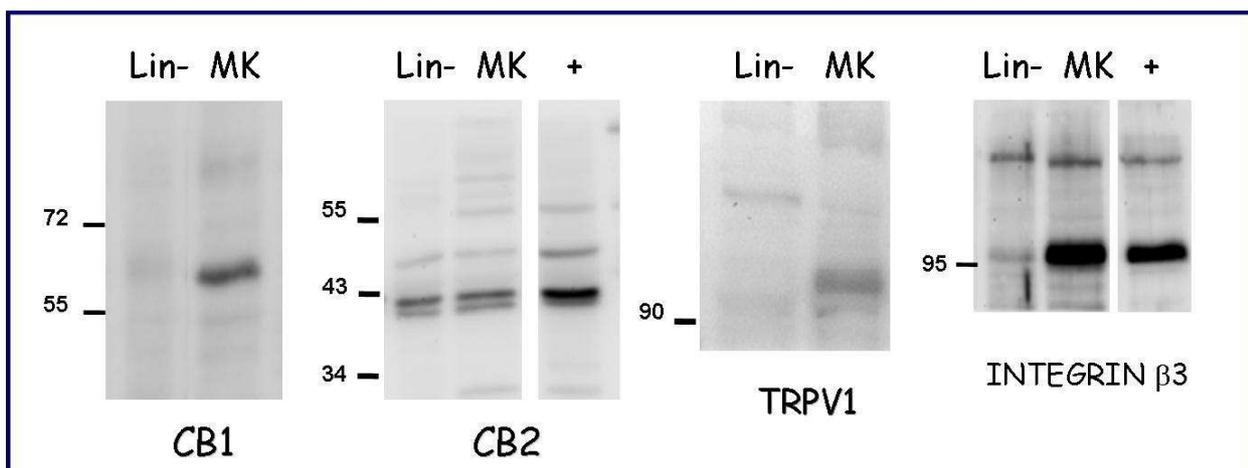


Figura 7: Cellule murine derivanti da midollo osseo vengono isolate e messe a differenziare per 4 giorni in presenza di TPO, IL-6 e IL-11. Cellule Lin-/c-kit+ (cellule al giorno 0) e megacariociti maturi (MK) vengono lisati in seguito a gradiente discontinuo di BSA (3%-2%-1%); le proteine separate mediante corsa su gel lineare di poliacrilamide, trasferite con Western Blotting su membrana PVDF (polivinildene di fluoruro) e marcate con i specifici anticorpi. L'integrina $\beta 3$

rappresenta il marker di differenziamento (controllo positivo : piastrine murine) e come controllo positivo per la presenza del recettore CB2: cellule Jurkat (+). L'immagine è rappresentativa di 3 esperimenti indipendenti.

Real-Time PCR

Variazioni di espressione genica del sistema endocannabinoidale, che comprende oltre agli endocannabinoidi gli enzimi deputati alla sintesi e alla degradazione degli stessi, sono state analizzate in diverse fasi del differenziamento megacariocitico, mediante analisi di Real-Time PCR semi-quantitativa. Cellule staminali ematopoietiche murine sono state raccolte da midollo osseo ed indotte al differenziamento. L'RNA estratto è stato opportunamente quantificato, retrotrascritto ed amplificato mediante real-time PCR semi-quantitativa. La presenza dei trascritti è stata valutata in base ai valori dei rispettivi $2^{-\Delta Ct}$ (ΔCt : ciclo soglia del trascritto in analisi meno ciclo soglia del controllo endogeno GAPDH), in modo tale da evidenziare le differenze di espressione tra i vari geni ai differenti tempi di differenziamento senza dover necessariamente scegliere un normalizzatore. Come si vede dal grafico, l'espressione degli enzimi coinvolti nella degradazione degli endocannabinoidi, come FAAH e MAGL, è fortemente ridotta; anche nelle cellule Lin-/cKit+ l'enzima ABHD12 è espresso ma non è ulteriormente modulato, mentre l'enzima ABHD6 non è espresso nei megacariociti.

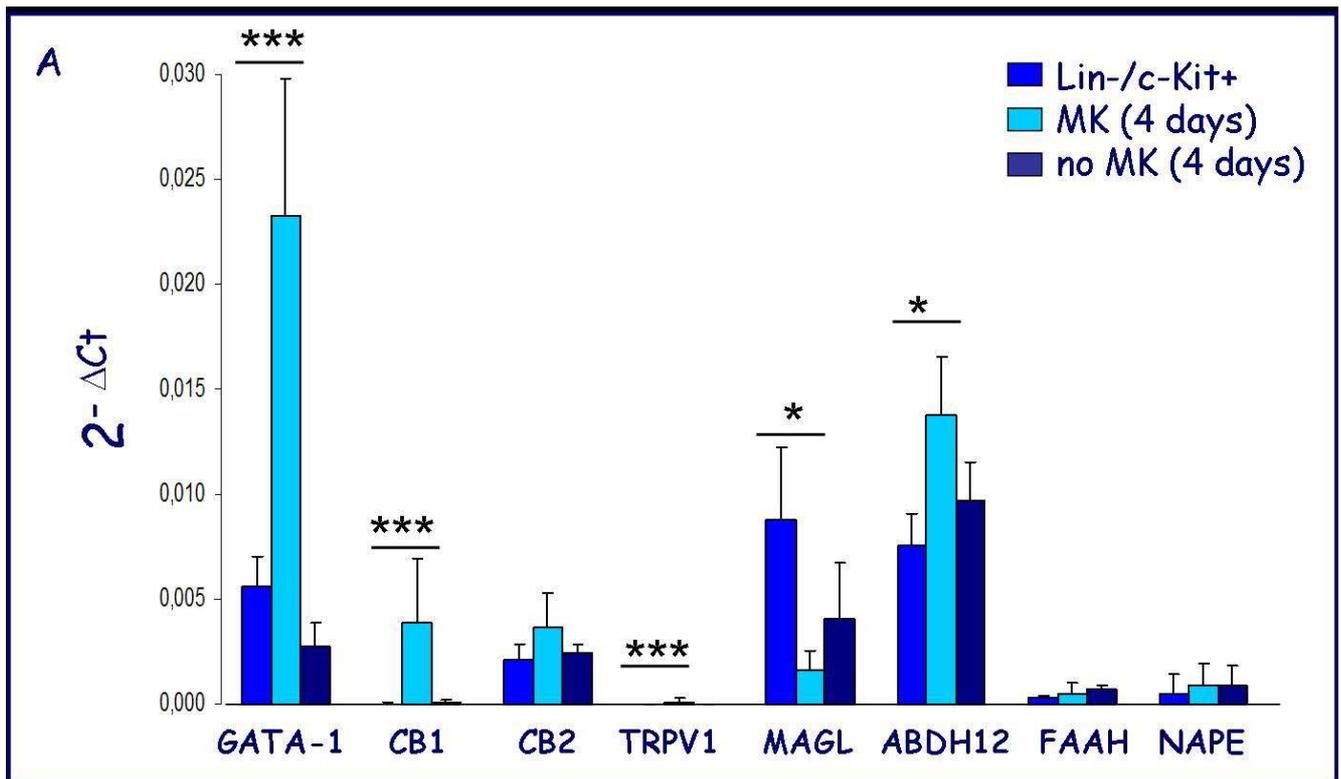


Figura 8: cellule murine Lin-/c-kit+ derivanti da midollo osseo vengono fatte differenziare in presenza di TPO, IL-6, e IL-11. RNA viene estratto da cellule Lin-/c-kit+, da megacariociti maturi e da cellule non megacariocitiche (no MK) a seguito di gradiente discontinuo di BSA (3%-2%-1%). Analisi in Real-Time del sistema endocannabinoide, i livelli dell'amplificato vengono normalizzati rispetto al gene housekeeping di controllo, GAPDH. I trascritti di mRNA vengono valutati in base ai valori dei rispettivi ΔCt . Le barre rappresentano la media \pm la deviazione standard di 5 esperimenti indipendenti. Analisi statistica: t-test *** $p < 0.01$; ** $p < 0.05$; * $p < 0.1$.

Endocannabinoidi e differenziamento cellulare: poliploidizzazione – citofluorimetria a flusso

Per valutare se gli endocannabinoidi fossero in grado di influire sul grado di poliploidizzazione megacariocitaria ho 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 FACScalibur e analizzati in un dot-plot che correla dimensioni cellulari (FSC) e granulosità cellulare (SSC). Com'è possibile osservare in figura, già al giorno 3 e in maniera ancor più consistente al giorno cinque, è presente una popolazione di cellule chiaramente differenziate. L'area selezionata

in rosso rappresenta il gate scelto per le successive analisi: contiene cellule con aumentate dimensioni e complessità cellulare, quindi differenziate.

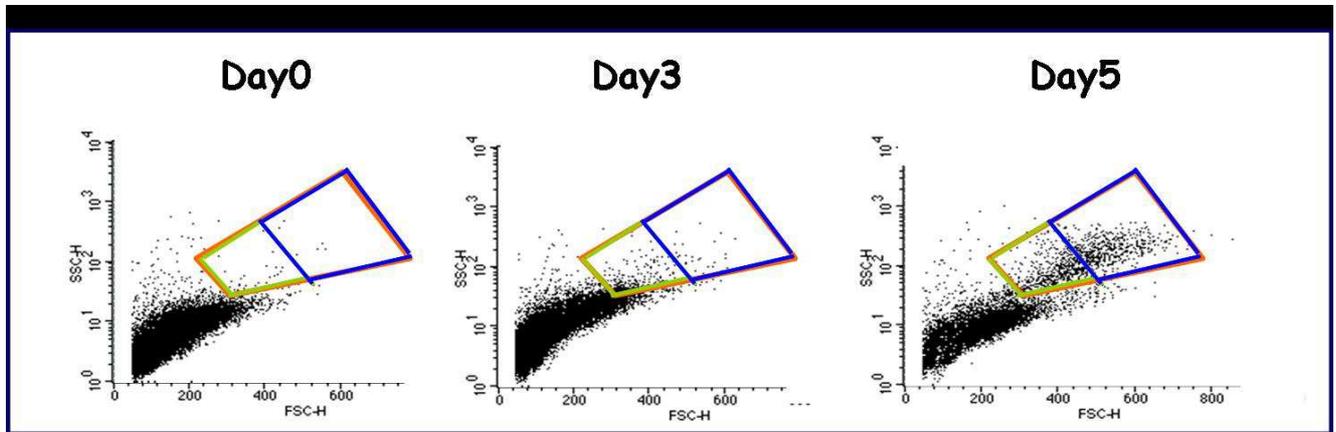


Figura 9: AUMENTO DI DIMENSIONI CELLULARI DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO – SCATTER PLOT: cellule ai giorni 0, 3 e 5 di differenziamento sono state analizzate mediante citofluorimetria a flusso e sortate rispetto alle dimensioni in un dot-plot SSC vs FSC. L'area selezionata (—) rappresenta il gate selezionato per le successive analisi e contiene cellule che presentano aumentate dimensioni cellulari e aumentata complessità all'interno della cellula (quindi marker di differenziamento all'interno del nostro sistema); (—) MK maturi; (—) MK intermedi. Le immagini sono rappresentative di quelle ottenute in tre diversi esperimenti indipendenti. Come atteso, con il trascorrere del tempo, si osserva un aumento significativo delle dimensioni e complessità delle cellule in fase differenziativa

Per valutare se l'endocannabinoide Metanandamide (MetAEA, analogo stabile dell'Anandamide) fosse in grado di influire sul grado di poliploidizzazione, 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 mostrano che il trattamento con cannabinoidi non modula il grado di poliploidizzazione nel nostro sistema cellulare.

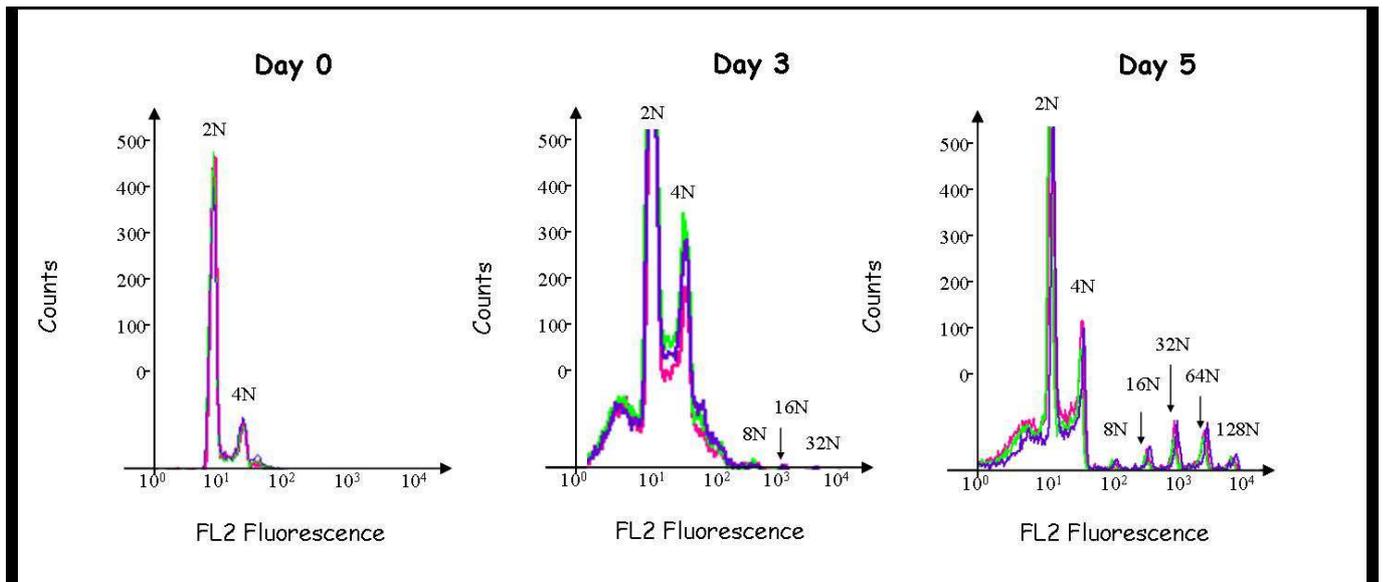


Figura 10: ANALISI DELLA POLIPLOIDIZZAZIONE NUCLEARE MEDIANTE CITOFUORIMETRIA A FLUSSO. La figura, rappresentativa delle altre ottenute in tre diversi esperimenti indipendenti, mostra il grado di poliploidizzazione dei megacariociti (numero dei picchi), durante i diversi giorni del differenziamento. 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. (—) mAEA, (—) mAEA and AM251, (—) controllo.

Per valutare quindi se la MetAEA fosse in grado di influire sul grado di differenziamento, 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), 10 μ M Am630 (potente e selettivo agonista inverso per il recettore CB2) e 10 μ M OMDM1 (inibitore della ricaptazione cellulare dell'anandamide) e differenziate. I campioni raccolti ai giorno 3 di differenziamento sono stati colorati 30' con propidio ioduro (vedi sezione materiali e metodi), per valutarne il contenuto di DNA. I risultati riportati in figura mostrano che la presenza di MetAEA durante il differenziamento aumenta in maniera statisticamente significativa il numero di cellule intermedie e di cellule mature attraverso il signalling del recettore CB1, mentre il signalling attraverso il recettore CB2 sembra ridurre il numero dei megacariociti maturi.

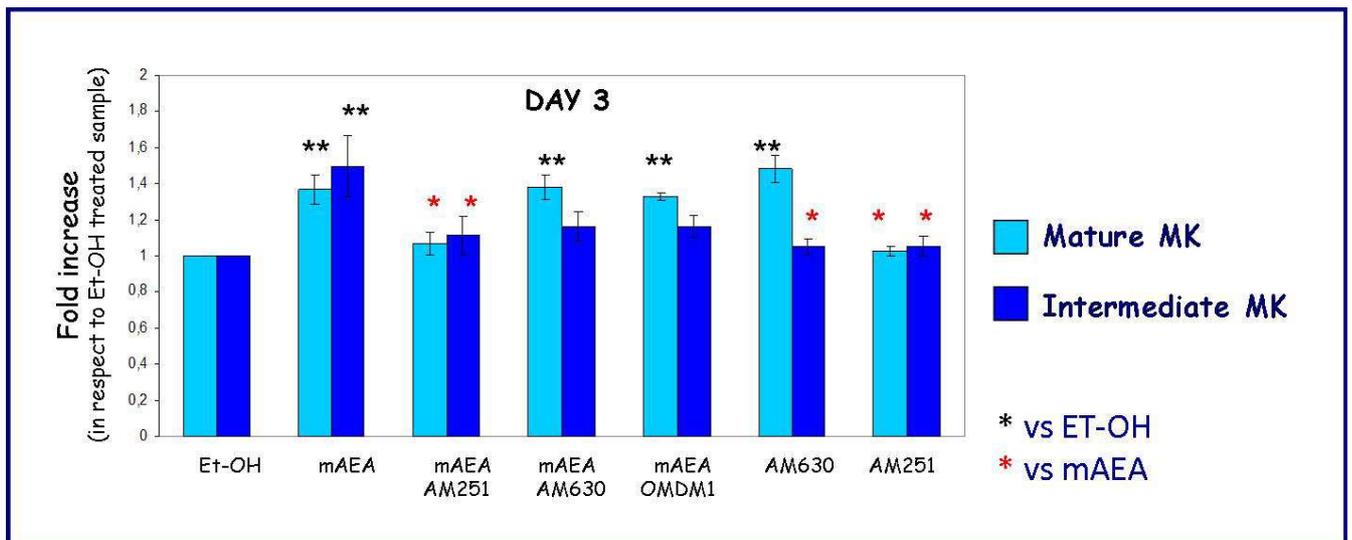


Figura 11: ESPRESSIONE DEL GRADO DI PLOIDIA DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO. I grafici a barre mostrano il numero di cellule mature al giorno 3 del differenziamento in campioni di controllo o messi a differenziare in presenza di MetAEA sola o con AM251, AM630 e OMDM1. La MetAEA, attraverso il CB1, induce un significativo aumento del numero di cellule mature mentre attraverso il CB2 riduce il numero dei megacariociti maturi. 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 ANOVA * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

ENDOCANNABINOIDI E MEG-01

Parallelamente all'analisi del differenziamento megacariocitario su megacariociti murini ho avviato esperimenti preliminari su cellule MEG-01 per valutare se la presenza o meno degli endocannabinoidi in coltura potesse influenzare il grado di differenziamento di queste cellule. I primi esperimenti sono stati effettuati su cellule poste in coltura in terreno RPMI addizionato di 10% siero a cui è stato aggiunto PMA 100 nM (il PMA è un estere del forbolo, potente attivatore tumorale in grado di attivare la via di trasduzione del segnale della proteina chinasi C (PKC), DMSO come controllo per indurre le cellule a differenziare verso la linea megacariocitaria e successivamente 10 μ M MetAEA, 10 μ M 2-AG ed EtOH come controllo. Le cellule sono state messe a differenziare e raccolte ai giorni 1, 3, 5 e 7 di differenziamento ed è stata eseguita analisi citofuorimetrica per analizzare il grado di ploidia di queste cellule. Da come si evince dalla figura solo la MetAEA e non il 2-AG è in grado di aumentare il grado di ploidia delle MEG-01.

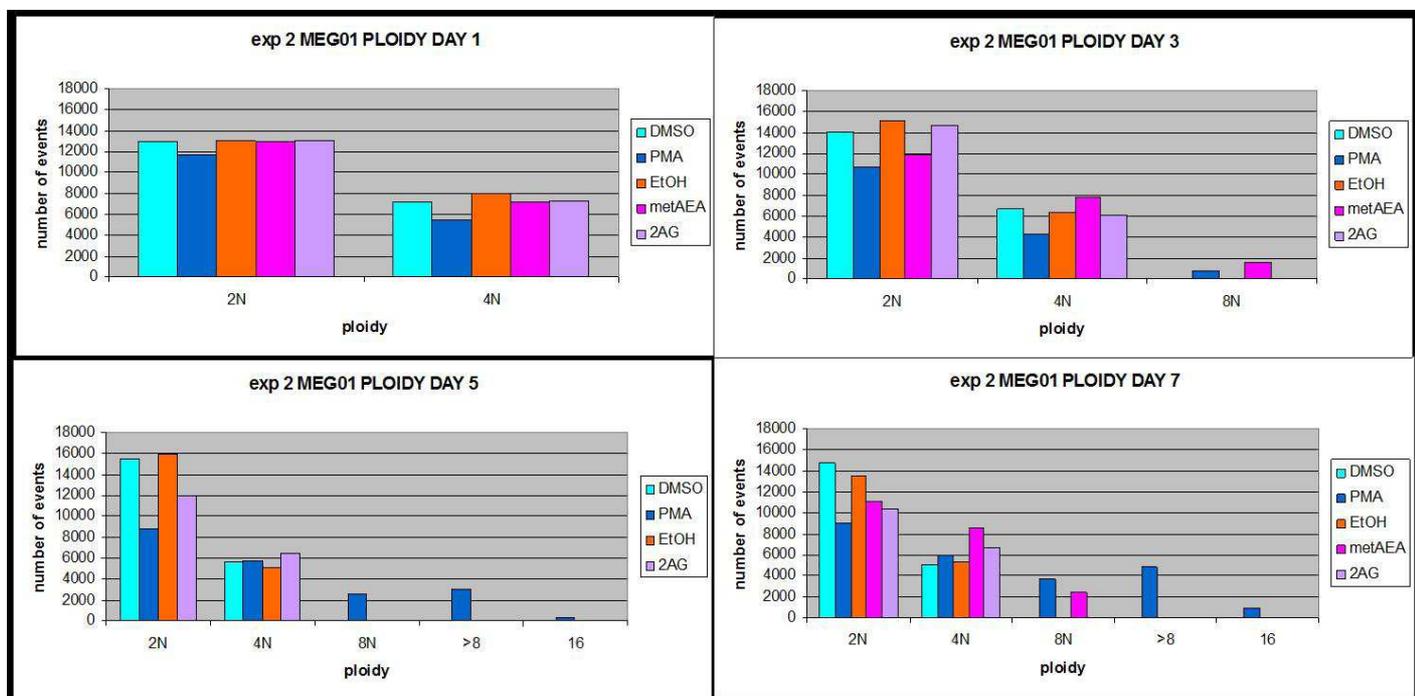


Figura 12: ESPRESSIONE DEL GRADO DI PLOIDIA DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO DELLE MEG-01. I grafici a barre mostrano il numero di cellule ai vari giorni di differenziamento in campioni di controllo o messi a differenziare in presenza di MetAEA, 2-AG, PMA. La MetAEA induce un aumento del numero di cellule mature mentre il 2-AG non ha effetti sul grado di ploidia delle cellule.

Conseguentemente a questi dati ho deciso di porre la mia attenzione solo sull'endocannabinoide MetAEA e ho effettuato esperimenti analoghi di citofluorimetria mettendo le cellule in coltura con 100 nM PMA, 10 μ M MetAEA da sola e in associazione con lo stesso PMA per andare a valutare un possibile fenomeno sinergistico delle due molecole sul grado di ploidia delle MEG-01, e ho raccolto le cellule ai giorni 3 e 5 di differenziamento. Dalla figura si evince un possibile effetto sinergistico dato dalla combinazione delle due molecole, anche se non significativo se messo in confronto all'azione del PMA o della MetAEA da sole.

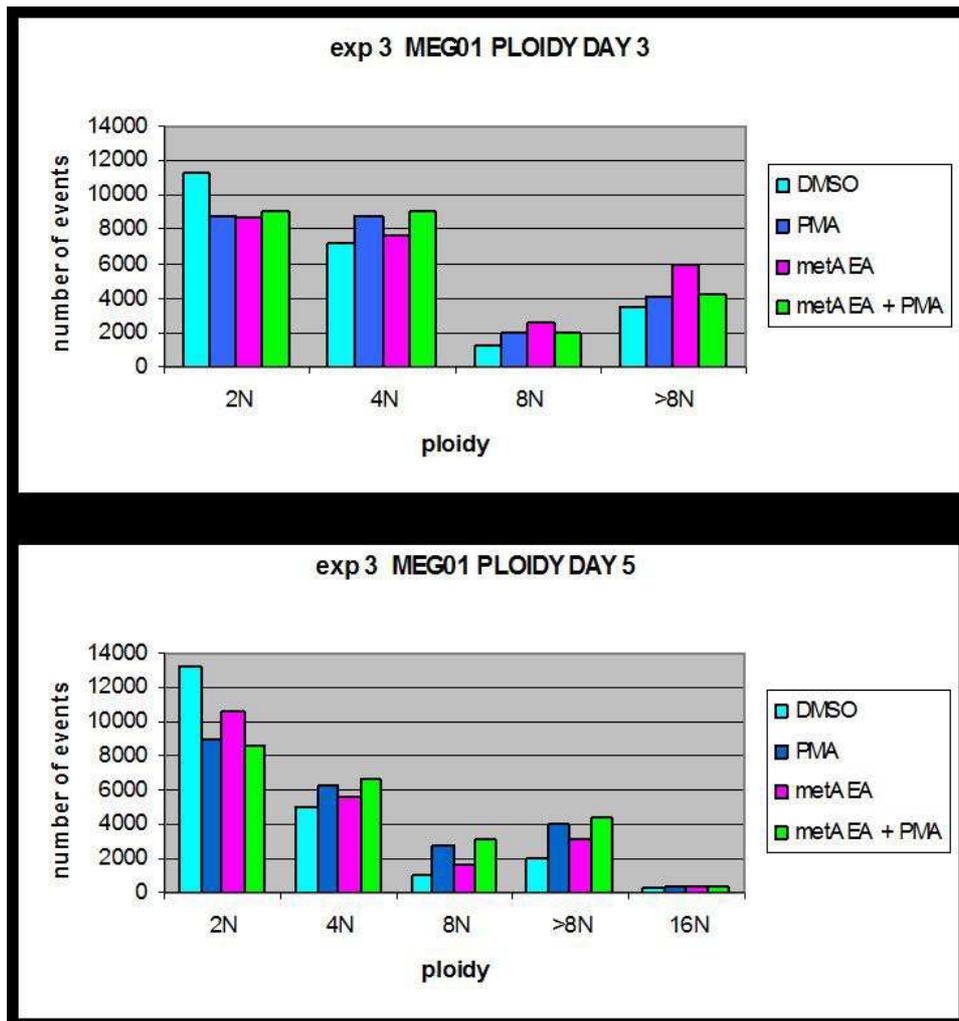


Figura 13: ESPRESSIONE DEL GRADO DI PLOIDIA DURANTE IL DIFFERENZIAMENTO DELLE MEG-01. I grafici a barre mostrano il numero di cellule ai vari giorni di differenziamento in campioni di controllo o messi a differenziare in presenza di MetAEA, PMA da soli e dati in associazione. L'associazione di MetAEA con PMA sembra avere un effetto sinergistico sulla ploidia delle MEG-01 anche se non statisticamente significativo se paragonato al solo PMA o MetAEA.

5. 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 maturi. La presenza dei principali recettori per gli endocannabinoidi, CB1, CB2 e TRPV-1 aumenta progressivamente negli stadi differenziativi considerati ad eccezione del recettore CB2 che rimane invariata.

Per valutare se gli endocannabinoidi svolgono un ruolo nel differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche murine verso la linea megacariocitaria, ho condotto diversi esperimenti : in Real Time-PCR per valutare i livelli di espressione del sistema endocannabinoide, che comprende oltre agli endocannabinoidi gli enzimi deputati alla sintesi e alla degradazione degli stessi, e ho trovato che l'espressione degli enzimi coinvolti nella degradazione degli endocannabinoidi, come FAAH e MAGL, è fortemente ridotta; anche nelle cellule Lin-/cKit+ l'enzima ABHD12 è espresso ma non è ulteriormente modulato, mentre l'enzima ABHD6 non è espresso nei megacariociti. Possiamo quindi dire che vi è un coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella regolazione del differenziamento.

Successivamente sono andata a valutare se gli endocannabinoidi fossero in grado di influire sul grado di poliploidizzazione megacariocitaria e ho deciso di valutare l'aumento di dimensioni cellulari in esperimenti di citofluorimetria a flusso. I dati che ho ottenuto mostrano come già al giorno 3 e in maniera ancor più consistente al giorno cinque, è presente una popolazione di cellule chiaramente differenziate ad indicare in maniera certa un coinvolgimento degli endocannabinoidi nel differenziamento.

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 però il trattamento con metanandamide (MetAEA) non aumenta il grado di poliploidizzazione del nostro sistema cellulare, ma è in grado di aumentare in maniera statisticamente significativa il numero di cellule intermedie e di cellule mature attraverso il signalling del recettore CB1, mentre il signalling attraverso il recettore CB2 sembra ridurre il numero dei megacariociti maturi; si conclude che, nel nostro sistema, l'azione biologica della MetAEA sia conseguente all'attivazione del CB1. Data la forte modulazione di espressione dei recettori cannabinici 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 cannabinico di tipo 1 durante questo processo.

Per quanto riguarda la valutazione del ruolo degli endocannabinoidi nel processo di differenziamento della linea cellulare megacarioblastica umana MEG-01, i primi dati preliminari suggeriscono un coinvolgimento della MetAEA nell'aumentare il grado di ploidia delle cellule trattate con endocannabinoidi, e un possibile effetto sinergico della stessa con il promotore tumorale e agente differenziativo PMA nell'incremento del grado di ploidia. È necessario condurre ulteriori esperimenti per la conferma o meno di questi dati, e successivamente andare ad indagare e chiarire quali siano le vie di segnalazione coinvolte in questo processo.

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, Pannacciulli 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, Stohman F. Megakaryocytopoiesis in the rat. *Blood*. 1965; **26**:20–34.
- Ebbe S. Biology of megakaryocytes. *Prog. Hemost. Thromb*. 1976; **3**:211–229.
- Eldor, A., Levine, R.F., Caine, Y.G., HyAm, E. & Vlodaysky, I. Megakaryocyte interaction with the subendothelial extracellular matrix. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1986; **215**:399–404.
- Gandhi, M.J., Drachman, J.G., Reems, J.A., Thorning, D. & Lannutti, B.J. A novel strategy for generating platelet-like fragments from megakaryocytic cell lines and human progenitor cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2005; **35**:70–73.
- Gerrard J, White J, Rao G, Townsend D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am. J. Pathol*. 1976; **101**:353–364.
- Gewirtz, A.M. Megakaryocytopoiesis: the state of the art. *Thrombosis and Haemostasis*. 1995; **74**, 204–209.
- 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-Agr o 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-Agr o 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.
- Steinhubl 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, SThrombocytopoiesis – 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

AA 2011-2012

10 ottobre 2011

"New trends in allergy and immunology"

Prof. Joseph A. BELLANTI

7 novembre 2011

"The resolution of inflammation: players and targets"

Prof. Mauro PERRETTI

20 dicembre 2011

"Galectins-carbohydrate binding protein: sweet or sour?"

Prof. Mauro PERRETTI

13 gennaio 2012

"Hepatocellular Carcinoma, novel advances from genomics to treatment"

Dr Rohini SHARMA

25 gennaio 2012

"Next-generation DNA sequencing and target arrays in the clinics "

Dr. Paolo FORTINA

8 marzo 2012

"Signalling pathways controlling integrin trafficking during invasion"

Dott.ssa Elena RAINERO

22 marzo 2012

"Molecular classification of multiple myeloma"

Prof. Antonino NERI

23 marzo 2012

"Role of Diacylglycerol kinases in the control of T cell activation and differentiation programs"

Prof.ssa Isabel MERIDA

28 marzo 2012

"Developing strategies for tissues specific targeting using peptides and antibodies isolated by in vivo phage display selection"

Prof. Costantino PITZALIS

29 marzo 2012

"The role of cutaneous HPV in skin cancer"

Prof. Ingo NINDL

14 giugno 2012

"Association of Merkel cell polyomavirus with human tumors"

Prof. Mauro TOGNON

15 giugno 2012

"High-throughput Biochemical Target Investigation Unveils a Novel Function of miR-21 as a Negative Modulator of Signal Transduction in T-lymphocytes"

Prof. Pino MACINO

18 giugno 2012

"SEDDA: Scale for Early Detection of Drug Abuse"

Dott. Daniel LLORET

21 giugno 2012

"Recent Advances in Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: from microRNA Regulation to Targeted Gene Transfer"

Prof. Luigi NALDINI

28 giugno 2012

"IFI16: innate recognition of double-stranded DNA - and beyond"

Prof. Søren Riis PALUDAN

10 luglio 2012

"Next generation sequencing in T-ALL"

Dr. Kim DE KEERSMAECKER

12 luglio 2012

"UHRF1 protein promotes epigenetic cross-talks and is involved in cancer progression"

Ian Marc BONAPACE

13 luglio 2012

"Molecular control of human fetal globin expression: towards a potential cure for β -thalassemia and sickle cell anemia"

Prof. Sjaak PHILIPSEN

Ciclo *“Neuronal Death: Recruitment of programmed necrosis and autophagy”*

Giovedì 19 luglio

“Brain, brain quite contrary how do you neurones die? Programmed cell death”

Venerdì 20 luglio

“Oxidative stress and recruitment of autophagy to brain cell death”

Prof. Philip BEART

SEZIONE 2:

PARTECIPAZIONI A CONGRESSI:

GSP 2012 Concordia
Concordia Sagittaria, 7-9 ottobre 2012

COMUNICAZIONI A CONGRESSI :

Altre comunicazioni:

Platelets 2012 International Symposium

Boston, 4-6 Giugno 2012

“Diacylglycerol Kinase Alpha: a negative regulator Of megacaryopoiesis and platelet function”

Sampietro S, Nalin M, Zhong X.P, Graziani A, Sinigaglia F, Bertoni A. (Poster)

Sib 2012

Chieti, 25-29 Settembre 2012

“Role Of Endocannabinoid Receptors in Megakaryocyte Differentiation”

Portanova P, Sampietro S, Nalin M, Bagarotti A, Sinigaglia F, Bertoni A. (Poster)

Euplan

Maastricht, 19-21 Settembre 2012

“Endocannabinoid modulate the number of megakaryocytes in the bone marrow”

Portanova P, Sampietro S, Nalin M, Bagarotti A, Sinigaglia F, Bertoni A. (Poster)

ARTICOLI SCIENTIFICI PRODOTTI NEL CORSO DEL DOTTORATO:

“ DEHYDROEPIANDROSTERONE-SULFATE INHIBITS THROMBIN-INDUCED PLATELET AGGREGATION”

Bertoni A, Rastoldo A, Sarasso C, Di Vito C, Sampietro S, **Nalin M**, Bagarotti A, Sinigaglia F.

Steroids. 2012 Feb;77(3):260-8. Epub 2011 Dec 13.

"THE PHYTO-OESTROGEN 8-PRENYLNARINGENIN INHIBITS AGONIST-DEPENDENT ACTIVATION OF HUMAN PLATELETS"

Di Vito C, Bertoni A, **Nalin M**, Sampietro S, Zanfa M, Sinigaglia F.

Biochim Biophys Acta. 2012 Nov;1820(11):1724-33. Epub 2012 Jul 3.