

UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

XVI CICLO DEL DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

**“RUOLO DI FATTORI DI CRESCITA E DI PKC- θ SU PROGENITORI
MEGACARIOCITICI E PIASTRINE”**

COORDINATORE SCIENTIFICO

PROF.SSA F. SINIGAGLIA

RELAZIONE DEL 4° ANNO DI ATTIVITA[^]

DI DANIELA PIETRAPIANA

ANNO ACCADEMICO 2003-2004

INTRODUZIONE AI LAVORI SVOLTI DURANTE IL VI°

ANNO DI DOTTORATO

Nei tre anni precedenti di attività di ricerca all'interno del dottorato in medicina molecolare, negli anni dal 2000 al 2003, mi sono occupata di studiare il ruolo di una isoforma di PKC, PKC- θ , nelle piastrine umane. Durante questo quarto ed ultimo anno di attività all'interno del dottorato, mi sono dedicata invece alla messa a punto un sistema sperimentale che mi permettesse di valutare l'importanza della PKC- θ nel differenziamento megacariocitico di cellule staminali. In contemporanea a questo lavoro, in collaborazione con la dott.ssa Marilena Sala del laboratorio di Istologia diretto dalla prof.ssa Prat, dove da anni studiano il fattore di crescita per gli epatociti (HGF), ho avviato uno studio atto ad identificare per la prima volta ed a caratterizzare il recettore per HGF, c-Met, nelle piastrine ed a valutare l'influenza di questo fattore di crescita sulla funzionalità piastrinica. Entrambe questi studi hanno dato risultati molto interessanti che hanno importanti implicazioni nei campi della medicina cardiovascolare e dello studio delle cellule staminali. I due progetti sono descritti separatamente in dettaglio qui di seguito. Non escludiamo in futuro di poter utilizzare il modello sperimentale del primo studio per indagare l'influenza di HGF sul differenziamento di progenitori mieloidi.

“Studio del ruolo di HGF nella modulazione della funzionalità piastrinica: caratterizzazione del recettore c-Met e del meccanismo di segnalazione. Una nuova strada per la cura delle malattie cardiovascolari”

INTRODUZIONE

Hepatocyte growth factor (HGF) o scatter factor è stato originariamente identificato come una citochina in grado di promuovere la crescita e la motilità delle cellule epiteliali. E' stato scoperto nel siero di ratti epatectomizzati, come potente mitogeno per gli epatociti di ratto in coltura (Nakamura et al., 1984). Successivamente è stato isolato da diverse altre fonti, in particolare da lisati piastrinici di ratto (Nakamura et al., 1986) e da plasma umano (Gohda et al., 1988). Nel 1991 Weidner et al. hanno scoperto che HGF e lo "scatter factor", un fattore descritto per la prima volta da Stoker et al. nel 1987, che è secreto dai fibroblasti ed è in grado di dissociare le colonie epiteliali, sono la stessa molecola. Quando le due attività, mitogenica e motogenica, sono integrate in modo coordinato, l'HGF induce la cosiddetta “crescita invasiva”, proprietà che contraddistingue l'HGF da altre citochine, e che sta alla base dei processi morfogenetici, responsabili della tubulogenesi e della ramificazione dei tubuli durante lo sviluppo embrionale e l'organogenesi. In effetti l'HGF è un potente fattore angiogenico (Bussolino et al., 1992). In vivo l'HGF si è dimostrato fattore di rigenerazione per fegato, rene e pancreas endocrino (Borowiak et al., 2004; Matsumoto e Nakamura, 1993; T Lopez-Talavera et al., 2004). D'altro canto la crescita invasiva, quando incontrollata, è anche alla base del processo metastatico tumorale (Comoglio et al., 2002).

HGF è un eterodimero legato da ponte disolfuro, composto da una subunità α di 55-65 kDa e da una subunità β di 32-36 kDa: le due subunità si originano per taglio proteolitico di un precursore biologicamente inattivo di 92 kDa. Questo è una tirosina chinasi transmembrana eterodimerica codificata dal proto-oncogene cMet, composta da una subunità α di 50 kDa extracellulare legata tramite ponte disolfuro alla subunità β di 145 kDa, che nel suo dominio extracellulare presenta il sito di legame per HGF e nel

dominio intracellulare presenta il dominio chinasi, motivi di regolazione e la sequenza di attacco per i diversi trasduttori ed adattatori una volta che questa sia fosforilata. Sequenzialmente, il legame con il ligando attiva il recettore, inducendone la dimerizzazione, stimolandone l'attività tirosina chinasi, inducendone la fosforilazione in specifici residui tirosinici all'interno del dominio chinasi e nel sito di attacco, permettendo il reclutamento dei vari trasduttori e adattatori del segnale intracellulari (Furge et al., 2000). Il recettore Met è espresso preferenzialmente sulle cellule epiteliali (Prat et al., 1991), ma anche cellule endoteliali, cellule dell'osso, macrofagi (Birchmeier et al., 2003) ed in diversi organi (Tashiro et al., 1990; Zarnegar et al., 1990). Come già dimostrato per altri recettori di fattori di crescita, anche il recettore Met interagisce con altre molecole espresse sulla membrana cellulare (Follenzi et al., 2000; Trusolino et al., 2001) e questo fa presupporre che il cosiddetto "cross-talk" sulla membrana possa modularne la funzione.

Negli ultimi anni l'attenzione di molti ricercatori si è focalizzata sullo studio del ruolo di HGF nel sistema cardiovascolare e nella patogenesi delle malattie cardiovascolari (Morishita et al., 1998). HGF ed il suo recettore Met sono espressi oltre che dalle cellule che compongono i vasi sanguigni, anche dalle cellule del sangue circolanti, come monociti, granulociti, nonché macrofagi e mastociti (Beilmann et al., 1997; Wislez et al., 2003; Takeda et al., 2004). L'HGF e il suo recettore Met svolgono un ruolo positivo sul miocardio: essi sono coinvolti nel suo sviluppo durante l'embriogenesi (Rappolee et al., 1996), e vengono riespressi ad alti livelli in seguito a danno cardiaco indotto da ischemia e riperfusione (Nakamura et al., 2000). Inoltre l'HGF si è dimostrato un fattore cardioprotettivo in vivo e anti-apoptotico in vitro (Nakamura et al., 2000), suggerendone possibili implicazioni terapeutiche nei casi di danno cardiaco (Duan et al., 2003). In aggiunta si è osservato che i livelli di HGF nel sangue correlano con l'aterosclerosi (Kawamoto et al., 2003; Yamamoto et al., 2002) e l'ipertensione (Komai et al., 2002). In definitiva l'importanza di HGF nel sistema cardiovascolare è risultata tale da essere addirittura classificato come "ormone cardiovascolare" (Morishita et al., 2002) ed il potenziale terapeutico di questo fattore di crescita nelle patologie cardiovascolari è così elevato che a tutt'oggi è già in atto lo sviluppo di strategie di terapia genica e di utilizzo di molecole di HGF ricombinante per future applicazioni in campo clinico (Aoki et al., 2000; Sakakura et al., 2000; Shimamura et al., 2004).

Nelle trombosi, come in tutte le più comuni malattie cardiovascolari, è ormai da tempo riconosciuto il ruolo chiave svolto dalle piastrine, che grazie alla loro capacità di aderire alla parete vasale danneggiata, anche in condizioni di elevata pressione sanguigna,

e alla loro capacità di formare aggregati, sono ritenute responsabili della formazione di trombi e placche ateromatose. Alcuni fattori di crescita quali PDGF (Platelet Derived Growth Factor) e VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) influenzano la funzionalità piastrinica. In quest'ottica un possibile ruolo di HGF e del suo recettore nelle piastrine non è mai stato indagato.

Recenti evidenze ottenute nel nostro laboratorio hanno dimostrato per la prima volta la presenza del recettore Met nelle piastrine. Questo è stato evidenziato in esperimenti di citofluorimetria con anticorpi monoclonali diretti contro il dominio extracellulare e in esperimenti di immunoprecipitazione e western blot con anticorpi diretti contro la coda C-terminale intracellulare ed ha dimostrato le stesse proprietà strutturali del recettore già caratterizzato in altre linee cellulari. Inoltre abbiamo osservato che il trattamento delle piastrine con HGF determina la fosforilazione in tirosina del recettore ed il reclutamento dei suoi principali trasduttori/adattatori, quali PI3-K e Gab-1. Sulla base di queste evidenze, sono stati fatti esperimenti per saggiare un potenziale ruolo di HGF sulla funzionalità piastrinica. Esperimenti preliminari di aggregometria hanno dimostrato che HGF è in grado di modulare negativamente l'aggregazione piastrinica indotta da trombina.

Questo effetto inibitorio di HGF sull'aggregazione potrebbe spiegare alcuni degli effetti benefici, precedentemente menzionati, che il fattore dimostra sul sistema cardiovascolare e potrebbe aprire la strada a nuove strategie farmacologiche per la cura delle più comuni cardiovasculopatie. Si potrebbe ipotizzare che HGF abbia un duplice effetto sul sistema cardiovascolare in caso di trombosi o di danno del miocardio: da un lato favorirebbe la sopravvivenza delle cellule cardiache e delle cellule dei vasi sanguigni e la riparazione dei tessuti che hanno subito il danno ipossico, dall'altra inibirebbe l'aggregazione piastrinica diminuendo il rischio trombotico.

Le terapie post-infarto o post-ischemiche maggiormente utilizzate, prevedono la somministrazione di potenti inibitori della aggregazione piastrinica, come l'Abciximab, un anticorpo antagonista del recettore per il fibrinogeno $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, i quali sono risultati molto efficaci nel trattamento acuto di queste patologie. Tuttavia, da quanto emerso in studi recenti, l'utilizzo di questi farmaci risulta problematico nei casi di terapie prolungate, a causa dell'insorgenza di frequenti fenomeni emorragici nei pazienti in trattamento (Brouse et al., 2004). L'utilizzo di un modulatore negativo dell'attivazione piastrinica, anziché di antagonisti totali, potrebbe risultare un notevole vantaggio nel trattamento prolungato di questi pazienti.

A questo proposito è utile sapere che nel laboratorio di uno dei partecipanti al progetto di ricerca sono stati sviluppati degli anticorpi monoclonali contro il dominio

extracellulare del recettore umano Met, che su cellule epiteliali ed endoteliali si sono dimostrati agonisti completi o parziali del recettore evocando tutte le risposte biologiche o soltanto quelle di motilità, se utilizzati in forma bivalente (Prat et al., 1998). Poichè essi mimano completamente o in parte gli effetti dell'HGF su tutti i tipi cellulari su cui sono stati finora saggiati, è prevedibile che siano funzionanti anche sulle piastrine. Un altro vantaggio dell'uso degli anticorpi monoclonali è il fatto che sono disponibili in grandi quantità in forma pura e, soprattutto, che essi sono facilmente riformattabili a seguito di digestione enzimatica controllata o mediante tecniche di biologia molecolare (frammenti Fab₂, Fab, scFv).

In conclusione, vista la crescente importanza attribuita a HGF nel sistema cardiovascolare, riteniamo lo studio degli effetti di questo fattore di crescita sulla funzionalità piastrinica e la caratterizzazione del signaling del suo recettore, un passo dovuto alla ricerca di base ed una strada da non lasciare intentata dalla farmacologia per la lotta contro le malattie cardiovascolari.

RISULTATI

IDENTIFICAZIONE DI C-MET PIASTRINICO IN CITOFUORIMETRIA

Campioni di piastrine, separate da sangue intero mediante gel-filtrazione, sono state fissate in paraformaldeide al 1%, lavate in PBS e marcate con un anticorpo monoclonale diretto contro la porzione extracellulare di c-Met. Dopo lavaggi in PBS, le piastrine sono state messe in presenza di un anticorpo secondario anti-mouse IgG coniugato con il fluorocromo FITC. L'eccesso di anticorpo è stato eliminato lavando le piastrine in PBS ed è stata eseguita l'analisi al citofluorimetro. Come controllo è stato utilizzato un campione di piastrine marcate con il solo anticorpo secondario.

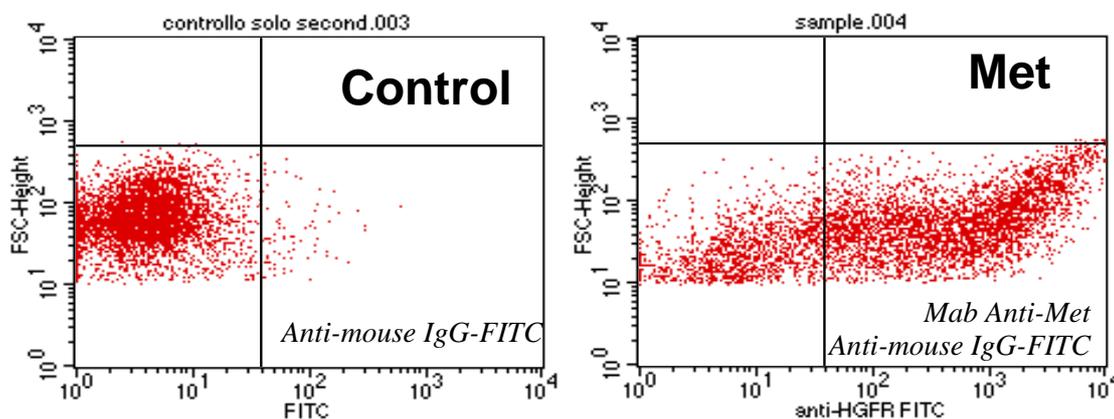


FIGURA 1

In figura 1 sono riportati i grafici dell'analisi al citofluorimetro di un campione di piastrine marcato con anticorpo anti c-Met ed il campione di controllo trattato con il solo anticorpo secondario coniugato FITC. I due grafici sono rappresentativi di 3 esperimenti identici e dimostrano la presenza di c-Met nelle piastrine; le linee orizzontali e verticali che tagliano i grafici delimitano i valori di FL1 e di FSC del campione di controllo. Si osservi che, mentre nel controllo quasi tutti gli eventi sono racchiusi nel quadrante in basso a sinistra, nel campione marcato anche con anticorpo anti- c-Met la maggior parte degli eventi si trova nel quadrante in basso a destra, vale a dire ad intensità di fluorescenza decisamente superiori a quelli del controllo, senza sostanziali variazioni sull'asse FSC.

ATTIVAZIONE DEL RECETTORE C-MET INDOTTA DAL TRATTAMENTO CON HGF

Campioni di piastrine gel-filtrate sono state stimolate per tempi diversi con 100 ng/ml HGF, quindi lisate ed il recettore è stato immunoprecipitato con un anticorpo monoclonale, DO24, diretto contro il c-terminale di c-Met. Gli immunoprecipitati sono stati separati mediante SDS-PAGE e trasferiti su membrana di PVDF, quindi marcati con anticorpi anti-fosfotirosina (anti-PY). Successivamente, dopo stripping, la membrana è stata marcata con un anticorpo specifico anti-c-Met.

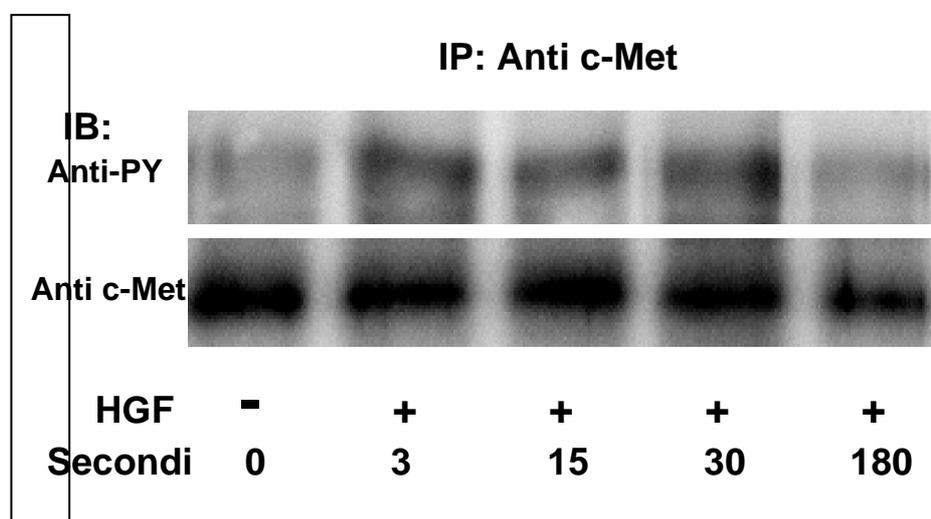


FIGURA 2

I risultati dell'analisi in Western-blot, riportati in figura 2, indicano che il trattamento delle piastrine con HGF è in grado di indurre una rapida fosforilazione in tirosina del recettore c-Met; infatti l'attivazione di c-Met risulta già massimale a soli 3 secondi di trattamento con HGF, mentre a 3 minuti si osserva una diminuzione della

fosforilazione in tirosina ad indicare una diminuzione dell'attivazione a tempi di stimolazione più lunghi, superiori ai 30''.

Le bande della striscia inferiore di figura 2 mettono in evidenza che per ogni lane sono state analizzate quantità paragonabili di recettore. Questo esperimento è rappresentativo di altri 3 esperimenti che hanno dato risultati analoghi.

IDENTIFICAZIONE DEI TRASDUTTORI DI C-MET PIASTRINICO

Campioni di piastrine gel-filtrate sono state stimolate per tempi diversi con 100 ng/ml HGF, quindi lisate ed il recettore è stato immunoprecipitato con un anticorpo monoclonale, DO24, diretto contro il C-terminale di c-Met. Gli immunoprecipitati sono stati separati mediante SDS-PAGE e trasferiti su membrana di PVDF, quindi marcati con anticorpi anti-fosfotirosina (anti-PY).

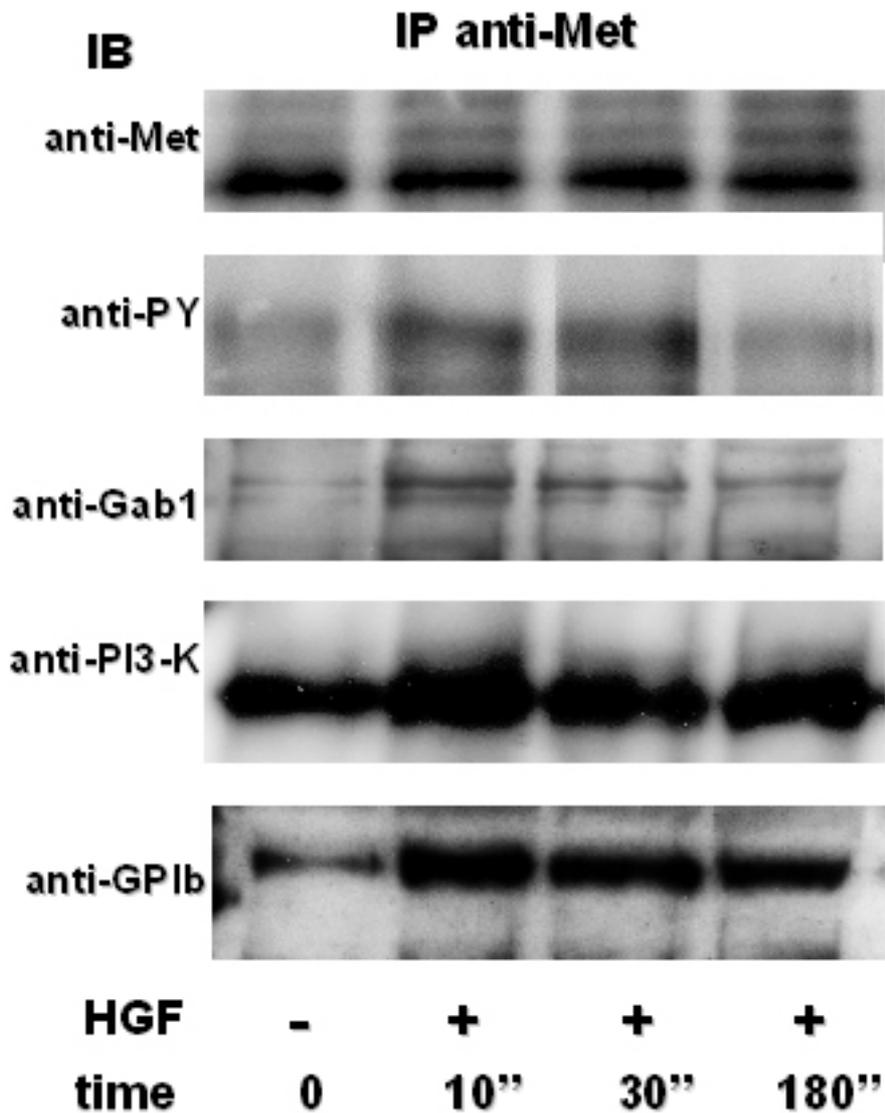
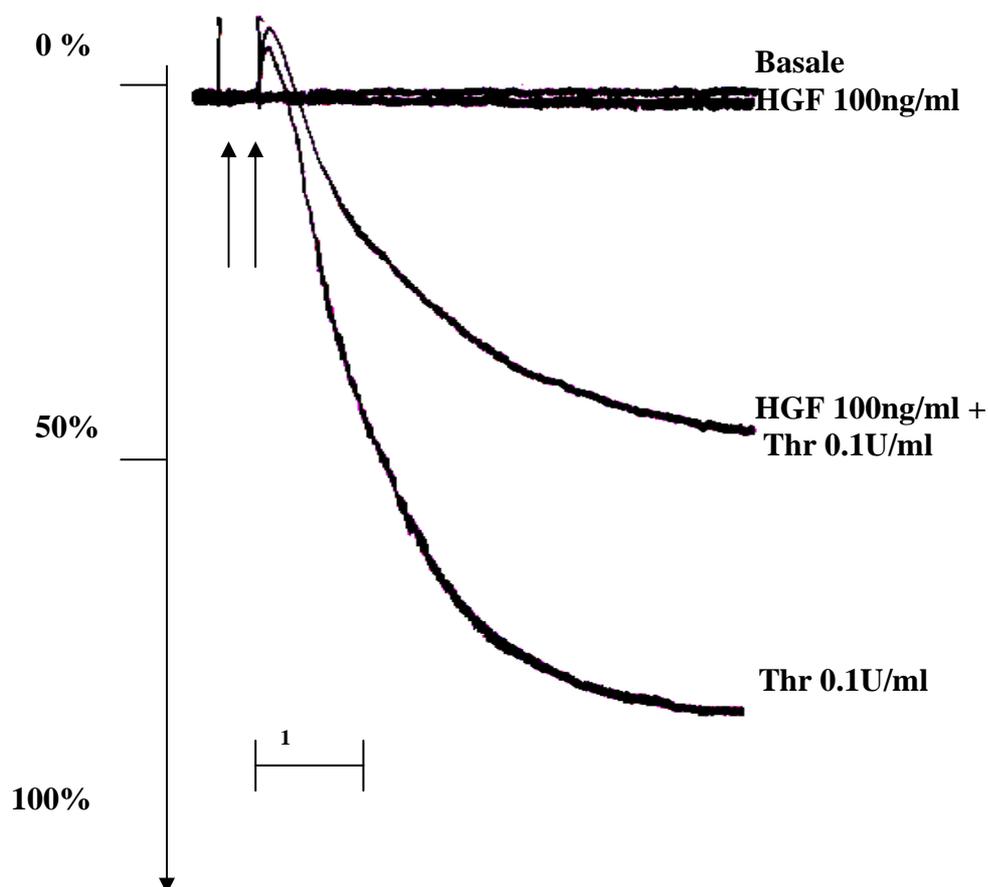


FIGURA 3

Successivamente, dopo stripping, la membrana è stata marcata con un anticorpo specifico anti-c-Met. Inoltre, la stessa membrana è stata marcata rispettivamente con gli anticorpi anti-Gab1, anti-PI3-K e anti-CD41 (anti-GP1b). I risultati ottenuti confermano la rapida e transiente fosforilazione di c-Met a seguito di stimolazione con HGF, inoltre dimostrano l'associazione al recettore di due suoi noti trasduttori, quali Gab-1 e PI3-K; entrambe queste proteine aumentano nei campioni derivati da piastrine stimulate con HGF. Infine, negli immunoprecipitati di c-Met da piastrine stimulate con HGF compare anche la glicoproteina 1b, che, come Gab-1 e PI3-K, associa precocemente ed in maniera stabile nel tempo. La marcatura con anticorpi anti c-Met, confermano che l'analisi in Western-blot dei diversi campioni è stata eseguita su quantità paragonabili di recettore. In figura 3 è riportato un esperimento che è rappresentativo di altri esperimenti che hanno dato identici risultati.

INFLUENZA DI HGF SULLA FUNZIONALITÀ PIASTRINICA

Campioni di piastrine, separate da sangue intero mediante gel-filtrazione, sono state risospese in tampone in presenza di 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ e 2 mM Glucosio, ad una concentrazione di 4 x 10⁸ piastrine per ml ed analizzate all'aggregometro di Born.



— Tempo (minuti)

FIGURA 4

I tracciati in figura 4 rappresentano variazioni percentuali dell'assorbanza dei campioni in funzione del tempo e sono rappresentativi di quattro esperimenti che hanno dato identici risultati. Si osservi che, sebbene il trattamento con il solo HGF non induca variazioni di assorbanza rispetto al basale, il pretrattamento con HGF è in grado di inibire di circa il 50% l'aggregazione indotta da basse dosi di trombina. La freccia nera a sinistra in figura 4 indica il momento dell'aggiunta del HGF, mentre quella a destra quello dell'aggiunta della trombina.

INIBIZIONE DI HGF DELL'AGGREGAZIONE INDOTTA DA TROMBINA

Campioni di piastrine, separate da sangue intero mediante gel-filtrazione, sono state risospese in tampone in presenza di 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ e 2 mM Glucosio, ad una concentrazione di 4 x 10⁸ piastrine per ml ed analizzate all'aggregometro di Born.

Per verificare la cinetica dell'inibizione dell'aggregazione indotta da HGF, i campioni sono stati trattati per tempi diversi con 100 ng/ml HGF prima di essere stimolati con 0,1 U/ml trombina.

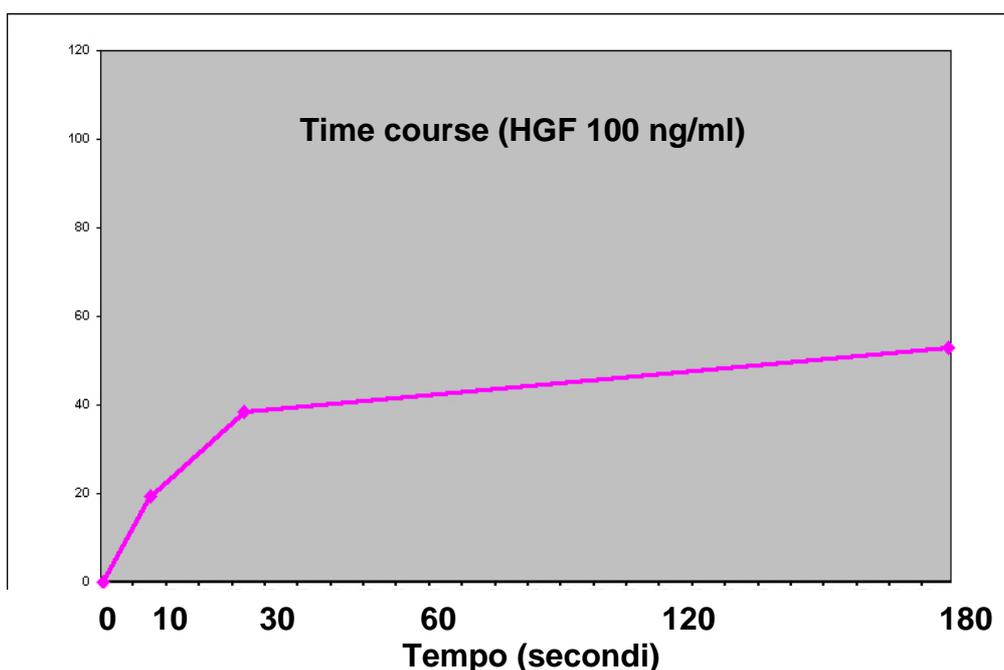


FIGURA 5

In figura 5 sono riportati i dati sulla cinetica in termini di percentuale di inibizione dell'aggregazione dei campioni stimolati con trombina in presenza di HGF rispetto ai campioni di controllo trattati con la sola trombina. Il grafico indica che già a 10 secondi di pretrattamento con HGF si osserva una inibizione dell'aggregazione indotta da trombina

del 20% e che a 30 secondi di pre-stimolo l'effetto inibitorio di HGF è pressoché massimale.

In altri esperimenti, i campioni di piastrine sono stati pretrattati per 30 secondi con diverse dosi di HGF prima di essere stimolati con 0,1 U/ml di trombina.

I risultati ottenuti sono rappresentati in figura 6: gli istogrammi rappresentano i valori relativi dell'aggregazione piastrinica e ed i punti uniti dalle linee blu rappresentano le percentuali di inibizione dell'aggregazione per ciascuna delle dosi di HGF prese in considerazione. Si osservi che HGF inibisce l'aggregazione piastrinica in maniera dose-dipendente, in particolare, già a 1 ng/ml, HGF inibisce l'aggregazione del 20%, mentre l'inibizione massimale, ovvero superiore al 60%, la si osserva solo pretrattando le piastrine con 100 ng/ml HGF.

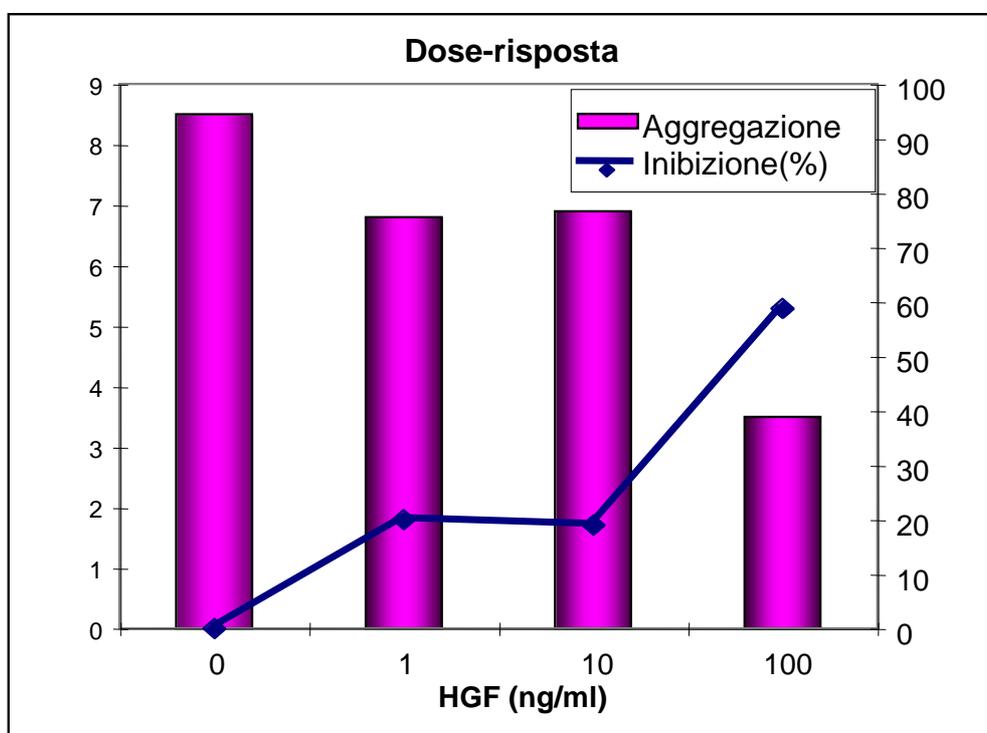


FIGURA 6

INIBIZIONE DI HGF DELL'AGGREGAZIONE INDOTTA DA TXA2

Campioni di piastrine, separate da sangue intero mediante gel-filtrazione, sono state risospese in tampone in presenza di 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ e 2 mM Glucosio, ad una concentrazione di 4 x 10⁸ piastrine per ml ed analizzate all'aggregometro di Born.

E' stata valutata innanzitutto la cinetica dell'inibizione di HGF sull'aggregazione indotta da un analogo del Trombossano A2 (TXA2), chiamato U46619 (U46). In figura 7 si può osservare come HGF inibisca l'aggregazione indotta da U46 già a 10 secondi di pretrattamento con 100 ng/ml HGF e come l'inibizione sia già pressoché massimale a 30

secondi di pretrattamento. Diversamente dalla trombina però, l'effetto inibitorio di HGF sull'aggregazione indotta da U46 risulta essere molto più marcato, a 30 secondi di pre-stimolo l'inibizione di HGF è pressochè totale.

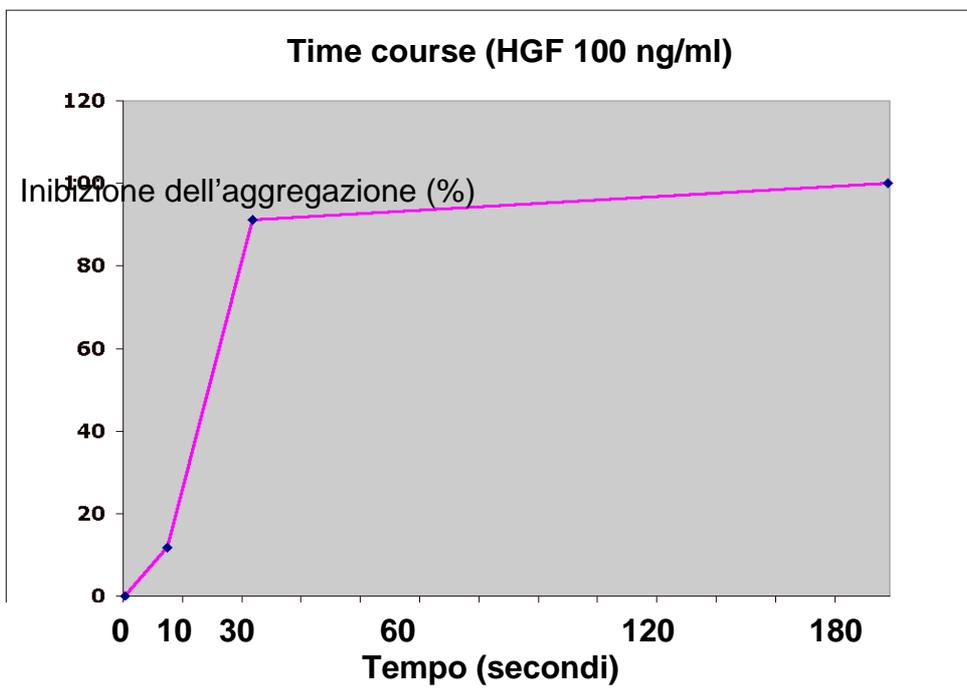


FIGURA 7

In altri esperimenti, i campioni di piastrine sono stati pretrattati per 30 secondi con diverse dosi di HGF prima di essere stimolati con U46619 μM .

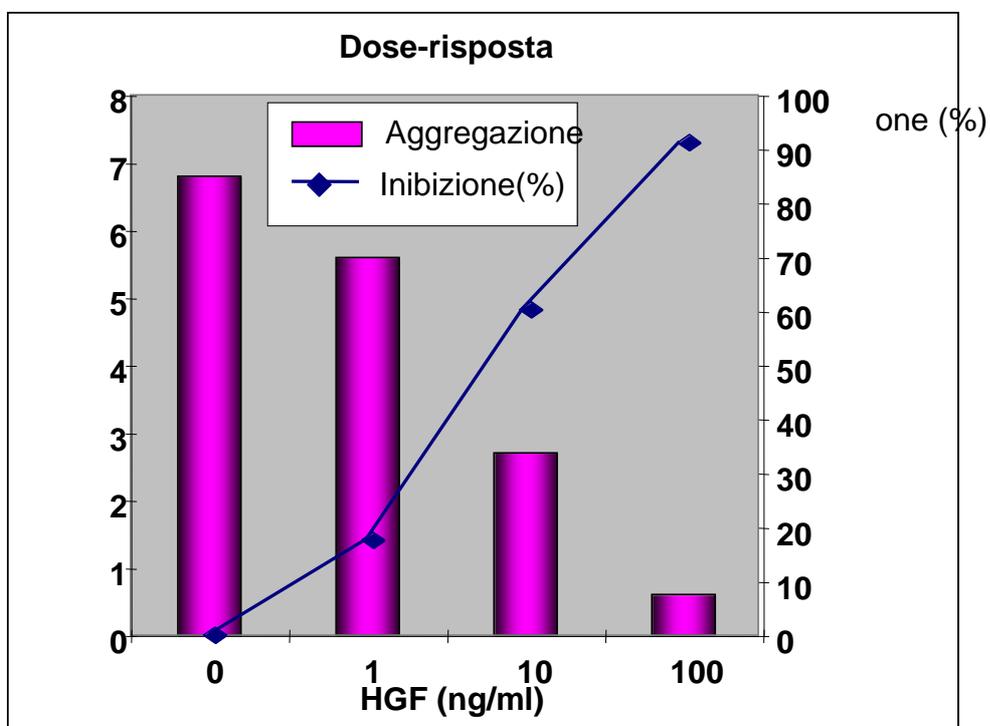


FIGURA 8

I risultati ottenuti sono rappresentati in figura 8: gli istogrammi rappresentano i valori relativi dell'aggregazione piastrinica e ed i punti uniti dalle linee blu rappresentano le percentuali di inibizione dell'aggregazione per ciascuna delle dosi di HGF prese in considerazione. Si osservi che HGF inibisce l'aggregazione piastrinica indotta dall'analogo del TXA2 in maniera dose-dipendente, in particolare, già a 1 ng/ml HGF inibisce l'aggregazione del 20%, mentre con 100 ng/ml HGF la percentuale di inibizione supera il 90%.

CONCLUSIONI

In questo lavoro è stato identificato per la prima volta il recettore per HGF, c-Met, nelle piastrine umane. La presenza del recettore nelle piastrine è stata provata dal riconoscimento del recettore da parte di diversi anticorpi, in grado di legare la porzione C-terminale o quella N-terminale della subunità maggiore di c-Met. I dati ottenuti al citofluorimetro, che indicavano l'espressione di c-Met sulla superficie piastrinica, sono stati confermati da esperimenti di immunoprecipitazione e Western-blot. Inoltre è stato dimostrato che il trattamento con HGF è in grado di indurre fosforilazione in tirosina di c-Met, evento che è generalmente considerato corrispondente allo stato attivato del recettore. Questo stato di attivazione di c-Met nelle piastrine è transiente ed è indotto precocemente a seguito dello stimolo con HGF, infatti già a tre secondi è visibile un livello di fosforilazione massimale che viene mantenuto almeno fino a 30 secondi, per poi decrescere a 3 minuti. Questa attivazione transiente è in grado di reclutare Gab-1 e PI3-K, i quali sono generalmente considerati trasduttori specifici di c-Met (in particolare Gab-1), come dimostrato in una gran varietà di tipi cellulari, confermando che anche nelle piastrine la fosforilazione di c-Met corrisponde all'innescò di eventi di segnalazione intracellulare. Diversamente dagli altri tipi cellulari però, c-Met piastrinico è in grado di reclutare nel suo stato attivato la glicoproteina 1b. La GP1b o CD42 è una glicoproteina transmembrana tipica di megacariociti e piastrine che appartiene ad un complesso denominato GP 1b-IX-V ed è generalmente considerata il recettore per il fattore di Von Willebrand (si veda parte introduttiva dello studio sul differenziamento megacariocitico riportato qui di seguito), anche se alcuni lavori presenti in letteratura indicano che GP1b sia in grado di funzionare anche da recettore sulla trombina. E' stato dimostrato che la trombina è in grado di legare il recettore, anche se gli effetti di questo legame a livello di signalling intracellulare non sono ancora stati chiaramente individuati.

Non siamo ancora in grado di comprendere l'implicazione della associazione di c-Met e la GP1b, tuttavia in letteratura diversi lavori dimostrano dei "cross-talk" tra il recettore di HGF ed altre glicoproteine di membrana in diversi tipi cellulari; generalmente questi "cross-talk" integrinici determinano una modulazione reciproca degli effetti dei due recettori. Esperimenti mirati a valutare il ruolo di questa associazione sono già in programma per il prossimo futuro, tuttavia esperimenti di aggregazione con diversi agonisti suggeriscono che il legame di HGF al suo recettore sia in grado di modulare gli effetti di questi agonisti sulle piastrine. In particolare, gli esperimenti da noi eseguiti in aggregometria indicano che HGF è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da trombina e da un analogo del trombossano A2, U46619, in maniera dose-dipendente e con una cinetica rapida. La percentuale di inibizione sull'aggregazione da trombina è risultata pressoché massimale già a 30 secondi di prestimolazione con 100 ng/ml HGF e circa pari al 50% di inibizione. L'effetto di HGF però risulta molto più grande sulla aggregazione indotta da U46619: a 30 secondi di stimolazione è già superiore al 90%.

Il fatto che le piastrine siano sensibili già alla dosi di 1 ng/ml di HGF, cioè a dosi solo 10 volte superiori a quelle fisiologiche lascia ben sperare per un possibile uso terapeutico di anticorpi specifici in grado di attivare il recettore per la cura delle più comuni patologie cardiovascolari.

Bibliografia

Aoki M, Morishita R, Taniyama Y, Kaneda Y, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor: potential gene therapy for ischemic diseases. *J Atheroscler Thromb.* 2000;7:71-6.

Beilmann M, Odenthal M, Jung W, Vande Woude GF, Dienes HP, Schirmacher P. Neexpression of the c-met/hepatocyte growth factor-scatter factor receptor gene in activated monocytes. *Blood.* 1997;90:4450-8.

Brouse SD, Wiesehan VG. Evaluation of Bleeding Complications Associated with Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors (November). *Ann Pharmacother.* 2004 Sep 21 [Epub ahead of print].

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:915-25. Review.

Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:10608-13.

Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol.* 1992;119:629-41.

Comoglio PM, Trusolino L. Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin Invest.* 2002;109:857-62. Review.

Duan HF, Wu CT, Wu DL, Lu Y, Liu HJ, Ha XQ, Zhang QW, Wang H, Jia XX, Wang LS. Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. *Mol Ther* 2003;8:467-74.

Follenzi A, Bakovic S, Gual P, Stella MC, Longati P, Comoglio PM. Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron. *Oncogene.* 2000;19:3041-9.

Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene.* 2000;19:5582-9. Review.

Godha, E., H. Tsubouchi, H. Nakayama, S. Hirono, O. Sakiyama, K. Takahashi, H. Miyazaki, S. Hashimoto, and Y. Daikuhara. Purification and partial characterization of Hepatocyte growth factor from plasma of a patient with hepatic failure. *J. Clin. Invest.* 1988 81:414-419.

Kawamoto R, Oka Y, Yoshida O, Takagi Y. Significance of serum circulating hepatocyte growth factor in the development of carotid atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2003;10:154-9.

Komai N, Ohishi M, Morishita R, Moriguchi A, Kaibe M, Matsumoto K, Rakugi H, Higaki J, Ogihara T. Serum hepatocyte growth factor concentration is correlated with the forearm vasodilator response in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2002;15:499-506.

Lopez-Talavera JC, Garcia-Ocana A, Sipula I, Takane KK, Cozar-Castellano I, Stewart AF. Hepatocyte growth factor gene therapy for pancreatic islets in diabetes: reducing the minimal islet transplant mass required in a glucocorticoid-free rat model of allogeneic portal vein islet transplantation. *Endocrinology.* 2004;145:467-74.

Matsumoto K, Nakamura T. Roles of HGF as a pleiotropic factor in organ regeneration. *EXS.* 1993;65:225-49. Review.

Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Aoki M, Matsushita H, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A, Higaki J, Ogihara T. Contribution of a vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), to the pathogenesis of cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb.* 1998;4:128-34. Review.

Morishita R, Aoki M, Yo Y, Ogihara T. Hepatocyte growth factor as cardiovascular hormone: role of HGF in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Endocr J.* 2002;49:273-84. Review.

Nakamura, T., K. Nawa, and A. Ichihara. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 122:1450-1459.

Nakamura, T., H. Teramoto, and A. Ichihara. Purification characterization of a growth factor from rats platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83:6489-6493.

Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest.* 2000;106(12):1511-9.

Prat M, Crepaldi T, Gandino L, Giordano S, Longati P, Comoglio P. C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol Cell Biol.* 1991;11(12):5954-62.

Prat M, Crepaldi T, Pennacchietti S, Bussolino F, Comoglio PM. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *J Cell Sci.* 1998;111:237-47.

Rappolee DA, Iyer A, Patel Y. Hepatocyte growth factor and its receptor are expressed in cardiac myocytes during early cardiogenesis. *Circ Res.* 1996;78:1028-36.

Sakakura Y, Kaibori M, Oda M, Okumura T, Kwon AH, Kamiyama Y. Recombinant human hepatocyte growth factor protects the liver against hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *J Surg Res.* 2000;92:261-6.

Shimamura M, Sato N, Oshima K, Aoki M, Kurinami H, Waguri S, Uchiyama Y, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation.* 2004;109:424-31.

Stoker, M., E. Gherardi, M. Perryman, and J. Gray. Scatter factor is a fibroblast derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 1987;327:239-242.

Takeda M, Suzuki Y, Obara N, Uchida N, Kawakoshi K. Expression of GDNF and GFRalpha1 in mouse taste bud cells. *J Comp Neurol.* 2004 Sep 23 [Epub ahead of print].

Tashiro, K., M. Hagiya, T. Nishizawa, T. Seki, M. Shimonishi, S. Shimizu, and T. Nakamura. Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87:3200-3204.

Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell*. 2001;107:643-54.

Weidner, K. M., N. Arakaki, G. Hartmann, J. Vandekerckhove, S. Wengart, H. Rieder, C. Fonotsch, H. Tsubouchi, T. Hishida, Y. Daikuhara, and W. Birchmeier. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991;88:7001-7005.

Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, Antoine M, Soler P, Cadranel J. Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res*. 2003;63:1405-12.

Yamamoto Y, Kohara K, Tabara Y, Igase M, Nakura J, Miki T. Plasma hepatocyte growth factor and the relationship between risk factors and carotid atherosclerosis. *Hypertens Res*. 2002;25:661-7.

Zarnegar, R., S. Muga, R. Rajja, and O. Michalopoulos. Tissue distribution of hepatopietin A: a heparin binding polypeptide growth factor for hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87:1252-1256.

RUOLO DI PKC- θ NEL DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE STAMINALI MIELOIDI A PROGENITORI MEGACARIOCITICI

INTRODUZIONE

DIFFERENZIAMENTO

La possibilità di modulare nel tempo e nello spazio l'attività dei vari gruppi di geni nucleari è stata probabilmente alla base della grande fioritura evolutiva degli Eucarioti, molti dei quali, grazie a tale possibilità, sono divenuti pluricellulari.

Un batterio, il cui genoma è continuamente attivo, da origine solo a cellule sempre eguali fra loro, che non traggono vantaggi dall'associazione perché tutte esercitano le stesse attività.

Gli organismi pluricellulari sono fatti da tipi cellulari diversi i quali, modulando differentemente l'attività di singoli gruppi genici, si specializzano ciascuno per determinate funzioni e quindi ricavano vantaggi dalla collaborazione reciproca all'interno di un unico individuo.

Il fenomeno per cui da una cellula iniziale (di solito lo zigote) si originano gradualmente tipi cellulari diversi, seppure muniti dello stesso genoma, si chiama *differenziamento*.

In un organismo adulto, le cellule dei vari tessuti differiscono fra loro per forma e funzioni. A livello molecolare, tali differenze riguardano soprattutto proteine di carattere strutturale e/o enzimatico. La fibra muscolare è enormemente più ricca di mioglobina, miosina, actina ed altre proteine contrattili di qualsiasi altra cellula, mentre un globulo rosso non contiene altro che emoglobina.

Alla base del differenziamento c'è quindi una particolare programmazione dell'attività genetica, che prima determina la formazione di tipi cellulari differenti, quindi li mette in grado di rimanere specializzati, mantenendo costantemente repressi le sintesi che non sono specifiche di quel tipo cellulare.

Il nucleo non è il solo responsabile di questa programmazione: infatti, le cellule dei vari tessuti di un organismo hanno tutte lo stesso DNA. La diversa regolazione dell'attività genetica che si attua nei vari tipi cellulari dipende da segnali chimici che giungono al nucleo dal citoplasma, oppure (sempre mediati dal citoplasma) da cellule circostanti o anche dall'ambiente esterno alla cellula.

Segnali chimici analoghi sono, del resto, prodotti anche nel corso della vita cellulare, indipendentemente dal differenziamento: i complessi cicli vitali della cellula eucariotica sono "programmati" correttamente da molecole specifiche che sono sintetizzate in determinati momenti e inducono il nucleo ad iniziare una nuova fase di attività. Le interazioni nucleo-citoplasma sono quindi alla base sia del differenziamento sia della normale attività di una cellula nel corso del suo ciclo vitale.

La costruzione dei vari tipi cellulari nel corso dello sviluppo dipende dalla struttura molecolare dell'oocita.

Fin dalla fecondazione, o anche prima in alcuni organismi, si può vedere che il citoplasma ovulare non è omogeneo per quanto riguarda la distribuzione di determinati costituenti, ed in particolare delle ribonucleoproteine (RNP). Si tratta, probabilmente, di mRNA temporaneamente inattivi in quanto bloccati da proteine (informosomi). Man mano che lo zigote si va segmentando in numerosi blastomeri (cellule ancora indifferenziate), ciascuno di questi eredita una diversa porzione del citoplasma ovulare e quindi delle RNP differenti. Più tardi, dai blastomeri si originano cellule che si avviano a differenziarsi in varie direzioni: alcune divengono muscolari, altre nervose, altre intestinali e così via. Tale processo è dovuto ad una diversa regolazione del loro DNA da parte di proteine citoplasmatiche particolari, costruite sui vari mRNA derivati dall'uovo e ora attivati.

Anche le esperienze di trapianto nucleare indicano che il citoplasma contiene molecole in grado di modificare le attività nucleari.

E' noto che il genoma di cellule differenziate trascrive relativamente pochi tipi di RNA, essendo in larga misura represso. Sperimentalmente si è osservato, con molte difficoltà, che se il nucleo di una di queste cellule è trapiantato in un uovo privato del proprio, nel nuovo ambiente il nucleo "differenziato" subisce una riprogrammazione: il DNA inizia ampi fenomeni di trascrizione ed il nucleo è in grado di produrre il normale sviluppo dell'uovo, con la genesi di numerosi e diversi tipi cellulari. Si sono, per esempio, ottenuti individui completi iniettando nuclei di cellule intestinali in uova previamente enucleate, in una specie di anfibi.

I fenomeni regolativi dell'attività genetica sono dunque reversibili, in base a stimoli provenienti dal citoplasma. Un'ulteriore prova si ha da esperienze di fusione cellulare (o ibridazione cellulare) in cui si è osservato che il citoplasma di fibroblasto umano o di topo era in grado di riattivare il nucleo eterocromatico di un eritrocita di pollo. Evidentemente, fattori presenti nel citoplasma del fibroblasto hanno attivato il DNA dell'eritrocita.

Infine, è stato dimostrato che gli ormoni steroidi attivano alcuni tipi cellulari (quelli degli organi bersaglio) penetrando nel loro citoplasma e legandosi a recettori specifici di natura proteica. Tali recettori, attivati dallo steroide, passano nel nucleo ed entrano in rapporto con determinate regioni del genoma sulle quali agiscono come dei regolatori della trascrizione. Prove al riguardo si sono ottenute per gli steroidi sessuali (testosterone, estrogeni e progesterone) e della corteccia del surrene nei Vertebrati e per quelli della muta larvale negli Insetti (ecdisione). Questi ormoni sono in grado, in alcuni casi, di promuovere l'amplificazione di alcuni geni.

L'amplificazione genica (ossia incremento numerico delle copie di un certo gene in attività) è stata indotta sperimentalmente anche in cellule di Mammiferi in coltura.

I principali eventi che caratterizzano le attività vitali della cellula sono dunque il risultato di interazioni talora complesse fra il nucleo, il citoplasma e l'ambiente circostante la cellula (P. Rosati: Citologia ed Istologia. EDI Ermes, 1987).

DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE EMATOPOIETICHE

Il Midollo Osseo è il principale tessuto emopoietico dell'adulto e si trova principalmente nelle ossa a struttura spugnosa. Una piccola percentuale di cellule ematopoietiche si riscontrano anche nel fegato e nella milza. Il midollo osseo emopoietico viene detto rosso mentre il circostante viene detto giallo ed è a struttura adiposa.

Nel midollo sono presenti cellule staminali, precursori delle cinque linee ematopoietiche (eritrocitaria, granulocitaria, megalocitaria, monocitaria e linfocitaria) e cellule mature. I processi che caratterizzano la maturazione sono peculiari per ogni tipo cellulare.

Il progenitore di tutte le cellule è una cellula staminale pluripotente capace di differenziarsi verso ogni linea mielo o linfopoietica. La cellula pluripotente deriva a sua volta da una cellula mesenchimale indifferenziata totipotente in grado di evolvere verso la serie emopoietica e le varie linee cellulari del connettivo (fibroblasti, mastociti, cellule adipose ecc.).

Le cellule del sangue si formano e maturano attraverso un processo che prende il nome di emopoiesi. Dalle cellule capostipiti discendono due linee principali, la linea mieloide e la linea linfoide. Queste sono cellule che si dividono continuamente, una delle due cellule originate continua a essere capostipite mentre l'altra inizia a differenziarsi, sotto lo stimolo dei fattori di crescita quali: eritropoietina, trombopoietina

e interleuchine. Da una cellula che inizia a differenziarsi hanno origine migliaia di elementi figurati del sangue. Da una generazione cellulare all'altra i precursori sono sempre più ricchi in proteine che caratterizzano la linea: emoglobina per gli eritrociti, GPIIb-IIIa e altre glicoproteine per la linea megacariocitica.

L'Emopoiesi ha inizio da una cellula staminale: CFU-A (colony forming unit); da questa cellula derivano due cellule progenitrici delle linee linfoidi (CFU-Ly) e mieloide (CFU-Mix); da CFU-Mix si differenziano altri tre tipi di progenitori: CFU-GM (granulociti e monociti), CFU-Eo (eosinofili), CFU-b/M/E (basofili, megacariociti e eritrociti). Dai progenitori si differenziano i precursori (blasti) che progredendo nel differenziamento diventano gli elementi figurati del sangue (fig. 1) (Blood, Principles and Practice of Hematology; 2nd Edition. Handin, Lux, Stossel. Lippincot Williams & Wilkins).

HEL: HUMAN ERYTHRO LEUKEMIA

La linea cellulare, coltivata dal 1985, deriva dal sangue periferico di un maschio caucasico di 30 anni, affetto da eritroleucemia.

Le HEL sono cellule leucemiche multipotenti che hanno delle caratteristiche comuni con le cellule progenitrici CFU-b/M/E, in grado di differenziarsi lungo la linea eritroide, se stimolate con Haemin, o seguendo la linea megacariocitica, se stimolate con forbolo miristato acetato (PMA). Un ruolo chiave nel differenziamento è svolto dalle protein chinasi C (PKC). Si è osservato che il differenziamento megacariocitico è caratterizzato da un aumento dell'espressione e dell'attività delle PKC: α , β I, ϵ , θ e ζ che raggiungono il picco di attività catalitica a 30 minuti dalla stimolazione con PMA, a 72 ore, nelle cellule differenziate a fenotipo megacariocitico, si rileva una diminuzione delle PKC tranne dell'isoforma ζ . Al contrario le PKC sono represses nel differenziamento lungo la linea eritroide (Zauli et al., 1996). Inibendo le PKC, con inibitori specifici, si sopprime il differenziamento megacariocitico, indotto dal trattamento con PMA (che è un attivatore delle PKC).

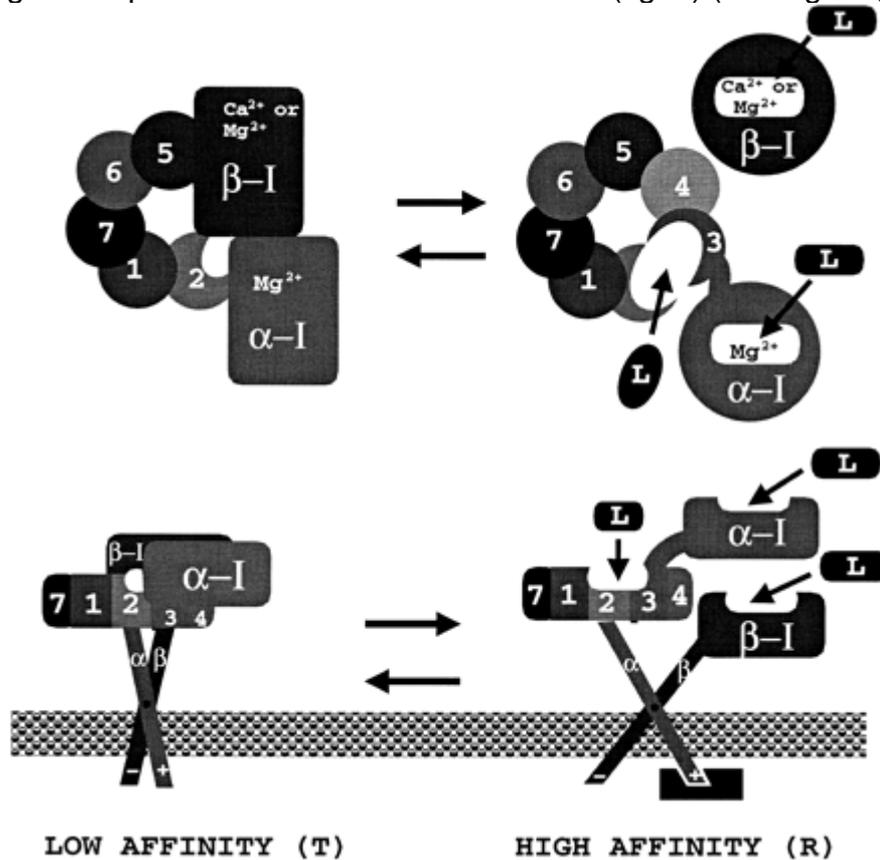
Durante il differenziamento megacariocitico, le cellule subiscono un blocco della replicazione, aumentano l'espressione della GPIIb-IIIa e divengono poliploidi (Hong et al., 1996). Esprimendo una maggiore quantità di GPIIb-IIIa, le cellule aumentano considerevolmente la loro capacità di adesione a piastre ricoperte con fibrinogeno (Boudignon et al., 1996). Le HEL, come altre linee derivanti dal sangue di pazienti affetti da leucemia, possiedono proprietà fenotipiche proprie delle cellule eritroidi, mieloidi e megacariocitiche; la GPIIb-IIIa e il complesso GPIb-IX-V sono dei markers specifici della linea megacariocitica (Nurden, 1997).

Le HEL possiedono anche altri recettori, tipici markers piastrinici, come quelli per trombina, ADP, epinefrina, PGE_1 . Trombina e PGE_1 provocano l'aumento delle concentrazioni citosoliche del cAMP e del Ca^{2+} , agendo con pathways differenti rispetto alle piastrine (Vittet et al., 1992). Stimolando con esteri del forbolo, le cellule vanno incontro a "spreading" con formazione di "stress fibers" (fibre di actina), smettono di proliferare ed iniziano cicli di endomitosi che generano cellule poliploidi, ovvero con corredi genetici multipli di 2N.

MARCATORI DI DIFFERENZIAMENTO NELLE HEL

La Glicoproteina IIb-IIIa

La glicoproteina GPIIb-IIIa è una integrina, la più abbondante espressa sulla membrana delle piastrine, formata da una catena α e una catena β . In seguito all'attivazione, questo recettore, va incontro a cambiamenti strutturali passando da una forma a bassa affinità ad una ad alta affinità, mediando l'interazione delle cellule con il fibrinogeno ed è essenziale nel promuovere il processo di aggregazione piastrinica e di adesione cellulare (fig. 2) (Boudignon, 1996).



Possiede, inoltre, siti di legame con: fibronectina, vitronectina, fattore di von Willebrand e trombospondina. La stimolazione delle cellule da parte di agonisti, in molti casi genera una variazione nell'espressione e/o una segnalazione "inside-out" che genera un cambiamento conformazionale nel dominio extracellulare, del recettore, portandolo alla sua forma aperta che possiede una maggiore affinità per il fibrinogeno. Successivamente, l'interazione della GPIIb-IIIa con il fibrinogeno porta generalmente ad una segnalazione "outside-in" mediata da trasduttori che legano il dominio intracellulare dell'integrina (come in genere PI-3K, Src e Pyk2) che induce una serie di eventi intracellulari che portano allo "spreading", alla riorganizzazione del citoscheletro ed al rilascio di vescicole. Questi eventi intracellulari coinvolgono almeno tre vie di segnalazione: quella delle tirosina chinasi, della PI3 chinasi e delle MAP chinasi.

Le HEL esprimono questa glicoproteina sulla propria membrana, ma l'espressione della GPIIb-IIIa è fortemente aumentata, se le cellule sono stimulate, con esteri del forbolo, a differenziare lungo la linea megacariocitaria.

Anche nelle HEL la GPIIb-IIIa media l'adesione al fibrinogeno, alla fibronectina ed alla vitronectina, e in seguito a stimolazione il complesso si rilocalizza nei siti di adesione focale (Boudignon, 1996).

Il Complesso Glicoproteico Ib-IX-V

Il complesso glicoproteico Ib-IX-V costituisce uno dei principali recettori di adesione presente sulla superficie piastrinica ed ha un ruolo vitale nell'emostasi primaria, in quanto agisce come recettore preferenziale per il Fattore di Von Willebrand (vWF) associato al collagene nella parete vasale danneggiata (Clametsen, 1997).

Il principale ruolo fisiologico del complesso GPIb-IX-V è di mediare l'iniziale adesione delle piastrine circolanti al vWF immobilizzato nella matrice sottoendoteliale ad elevate velocità di flusso. A bassi flussi ematici, l'adesione e lo sviluppo del trombo sono essenzialmente indipendenti dal GPIb-IX-V e coinvolgono altre molecole di adesione tra cui il collagene, l'integrina $\alpha_2\beta_1$, la glicoproteina GPVI e l'integrina GPIIb-IIIa, recettore per il fibrinogeno (Berndt et al., 2001). Il GPIb-IX-V è in grado di interagire anche con altri ligandi fisiologici come la trombina, la P-selectina espressa sulle cellule endoteliali e sulle piastrine ed il recettore di adesione dei leucociti Mac-1.

Il GPIb-IX-V è un complesso glicoproteico di membrana costituito da tre subunità transmembrana, GPIb, GPIX e GPV, prodotti da quattro geni differenti: i geni per GPIb α e GPIb β sono localizzati rispettivamente sui cromosomi 17 e 22, mentre i geni per il GPIX e GPV sono entrambi sul cromosoma 3.

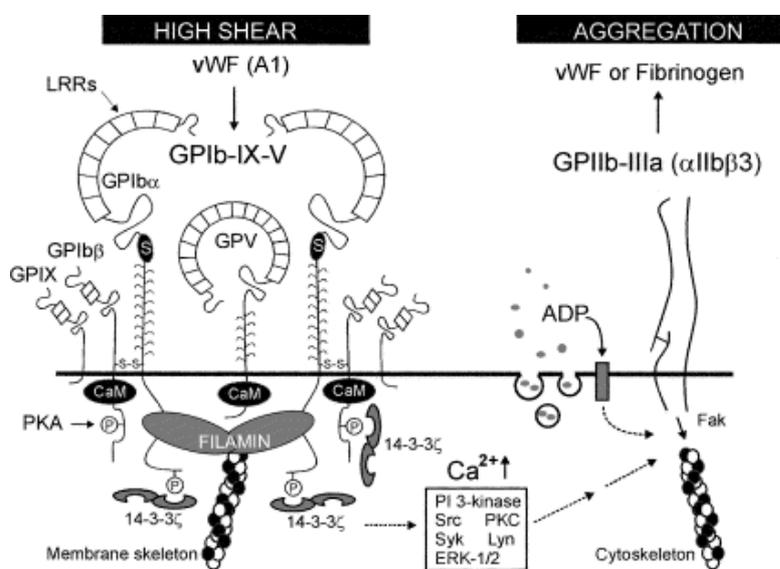


Fig. 3.

Tutte le subunità del GPIb-IX-V sono richieste per una stabile espressione del recettore funzionale (Andrews et al., 1999).

La più importante subunità del complesso è la GPIb α che contiene i siti di legame per il vWF, per il recettore di adesione Mac-1, per P-selectina, per la trombina, per il kininogeno ad alto peso molecolare e per il fattore XII. La coda citoplasmatica della GP

Ib α contiene i siti di legame per due proteine, “actin binding protein” (ABP-280) e 14-3-3 ζ , implicate nella regolazione dell’attività funzionale del complesso GPIb-IX-V.

Il principale ruolo fisiologico del GPIb-IX-V è di mediare l’iniziale adesione delle piastrine circolanti al vWF immobilizzato nella matrice sottoendoteliale esposta, in condizioni di elevato flusso sanguigno. Le piastrine che prendono contatto con il vWF immobilizzato traslocano sulla superficie sottoendoteliale dirette dal GPIb-IX-V: questa interazione tra il vWF ed il GPIb-IX-V ad alto tasso associazione/dissociazione rallenta la velocità delle piastrine e ne promuove il processo di rotolamento sulla matrice. La traslocazione continua finché esse non si attivano e sono arrestate dal legame del vWF con l’integrina GPIIb-IIIa (Berndt et al., 2001).

Il complesso GPIb-IX-V interviene negli eventi trombotici e post-trombotici anche promuovendo l’interazione tra piastrine e leucociti (Berndt et al., 2001).

L’espressione del complesso GPIb-IX-V è tardiva nelle HEL e varia nelle differenti linee cellulari, forse riflettendo stadi diversi di differenziazione o diversi gradi di neoplasie (Saito, 1997).

POLIPLOIDIA

Una cellula poliploide è caratterizzata dal possesso di copie multiple del numero di cromosomi aploide. La poliploidia può rappresentare la normale evoluzione di una cellula, come per i megacariociti, oppure essere indotta dallo stress. Qualunque sia l'origine e il tipo cellulare, la poliploidizzazione aumenta il metabolismo, le dimensioni e la massa della cellula, senza dover consumare energia per portare a termine tutte le fasi della divisione.

Si modificano, inoltre, l'espressione e l'attivazione dei geni con una grande varietà di proteine prodotte dalla cellula. L'alto contenuto di DNA potrebbe essere un vantaggio in alcune cellule specializzate, o essere dannoso per altre. La poliploidizzazione potrebbe indurre un aumento della trascrizione di un fattore di trasformazione, che può portare alla manifestazione fenotipica neoplastica (Ravid et al., 2002).

La poliploidia fu scoperta, da Strassburger nel 1910, nelle piante. Negli insetti è stata descritta tra gli artropodi e nella *Drosophila melanogaster*, che oltre alla poliploidia manifesta anche una politenia (concatenamento dei cromosomi) (Edgar, 2001). Nei Mammiferi è confinata solo ad alcune linee cellulari: negli epatociti si osservano due tipi di poliploidia, una in cui i nuclei sono distinti tra loro e l'altra in cui il nucleo non si divide, quest'ultima forma è associata all'invecchiamento (Kudryavtsev et al., 1993); un discreto numero di miociti, in particolare nel ventricolo sinistro, diventano poliploidi sotto stress e l'ipertrofia è associata ad un'ulteriore poliploidizzazione (Sandritter and Scomazzoni, 1964); in modelli animali ipertesi, si è rilevata la poliploidizzazione nella muscolatura liscia aortica (Owens, 1982) e in quella uterina; con l'invecchiamento aumentano i tireociti e le cellule del surrene poliploidi (Auer et al, 1985). Nei megacariociti, la poliploidia rappresenta il normale sviluppo.

I megacariociti danno origine, per frammentazione, alle piastrine. La poliploidia è associata ad un aumento delle dimensioni della cellula, degli mRNA e della sintesi delle proteine proprie delle piastrine come: la GPIIb e il complesso GPIb-IX-V. La differenziazione dei megacariociti ha origine da cellule multipotenti, nel midollo osseo, principalmente sotto lo stimolo della Trombopoietina (TPO).

La TPO dà inizio e mantiene la maturazione del megacariocita che va incontro a poliploidizzazione fino a 128N, anche se i megacariociti iniziano a frammentarsi in piastrine già allo stadio di 8N (Jackson, 1997).

Nei megacariociti umani è stato osservato che, durante il processo di poliploidizzazione, si ha la condensazione del DNA con la formazione di un fuso mitotico sferico e la dissoluzione della membrana nucleare, mentre non avvengono l'anafase B, la divisione del citoplasma e i cromosomi non segregano completamente (Roy et al., 2001).

Il processo di poliploidizzazione è regolato da cicline. In particolare, nei megacariociti di topo è stato osservato che la sovraespressione della ciclina D3 provoca un aumento del grado di poliploidia (Zimmet et al., 1997).

Studiando la poliploidia nelle HEL si è visto che la ciclina D3 è associata ad una subunità Cdk2 che ne incrementa l'attività chinastica nelle cellule poliploidi (Datta et al., 1998). Inoltre, la poliploidia sembra dipendere, sebbene in modo minore, dall'aumentata concentrazione di cicline di tipo A ed E che facilitano il ritorno in fase S (Datta et al., 1998).

In letteratura sono riportati i ruoli di altre proteine e complessi come ad esempio l'espressione di p21 e p27, che inibiscono la replicazione del DNA, arrestando il ciclo cellulare in fase G1 (Taniguchi et al., 1999); la ciclina B1 associata al fuso mitotico permette la condensazione del DNA, durante la poliploidizzazione questa ciclina è degradata da proteosomi (Ravid et al., 2001); la soppressione di AIM-1, proteina della famiglia delle Aurora necessaria allo svolgimento della fase M, favorisce la poliploidia.

In conclusione, la poliploidia è dovuta ad una fine regolazione di molti processi simultanei e una stimolazione complessiva di questi eventi induce un grado di poliploidia più alto, rispetto all'intervento su ogni singolo processo (Ravid et al., 2001).

LA FAMIGLIA DELLE PROTEINE CHINASI C

La PKC è considerata una componente chiave delle vie di segnalazione tra superficie cellulare e componenti intracellulari, essa è coinvolta nella trasduzione del segnale in risposta a stimolazioni di recettori da parte di ormoni, fattori di crescita, neurotrasmettitori, e regola pathways che portano alla proliferazione e al differenziamento cellulare.

Quest'enzima, presente in quasi tutti i tipi cellulari, funziona come recettore cellulare per il diacilglicerolo (DAG), secondo messaggero lipidico e forte attivatore diretto dell'enzima stesso.

Esistono diverse isoforme di PKC, per cui è possibile individuare una famiglia multigenica di specifiche proteine serina-treonina chinasi, che fosforilano una varietà di proteine cellulari; in base alle differenze strutturali si possono distinguere tre sottofamiglie: le PKC convenzionali, cui appartengono le isoforme α , β I, β II e γ (DAG, calcio e fosfolipidi dipendenti), le PKC nuove, isoforme δ , ϵ , θ e μ (solo DAG e fosfolipidi dipendenti), le PKC atipiche (DAG, fosfolipidi e calcio indipendenti).

Le singole isoforme differiscono anche per distribuzione tissutale, localizzazione intracellulare, specificità di substrato e reclutamento di cofattori, e sono quindi regolate in modo indipendente. La regolazione si basa essenzialmente sulla fosforilazione da cui dipende l'attivazione/inattivazione dell'enzima.

Dal punto di vista strutturale, i diversi isoenzimi sono costituiti da una singola catena polipeptidica che presenta due domini ben definiti: il dominio regolatorio amino-terminale e il dominio catalitico carbossi-terminale; la regione regolatoria possiede dei motivi coinvolti nel legame dei cofattori fosfolipidici e del calcio e partecipanti alle interazioni proteina-proteina, che regolano l'attività e la localizzazione della PKC. Nella regione carbossi-terminale si trova il dominio chinasi che include motivi coinvolti nel legame con l'ATP e i substrati.

Le PKC nel differenziamento mieloide

Le singole isoforme di PKC contribuiscono in modo differente alla segnalazione cellulare ed è dimostrato che l'espressione selettiva, nei progenitori ematopoietici, di alcune isoforme a scapito di altre, induce il differenziamento.

Un gruppo di ricercatori francesi ha dimostrato che esiste un'espressione tessuto-specifica delle PKC nelle cellule CD34⁺, nelle quali sono espresse solo nove delle undici isoforme presenti invece nel cervello. Essi hanno scoperto che esistono differenze qualitative (cambiamenti nell'espressione dei messaggeri delle diverse isoforme) tra il fenotipo dei progenitori indifferenziati e il fenotipo di granulociti/monociti, mentre ci sono differenze quantitative tra il fenotipo eritroide e quello megacariocitico. Le cellule differenziate presentano infatti una "up" o "down regulation" dell'espressione delle PKC: ad esempio nei megacariociti l'espressione di quasi tutte le PKC risulta enormemente aumentata rispetto alle cellule eritroidi, ai granulociti/monociti ed ai progenitori CD34⁺. In particolare, la PKC- θ risulta essere l'isoforma che subisce il maggior incremento d'espressione. Nei granulociti/monociti, invece, l'isoforma più espressa è la PKC- ζ .

Si possono quindi individuare due diverse tipologie di isoforme: quelle

esprese in modo ubiquitario (α , β , δ , ϵ), che presentano solo cambiamenti di espressione quantitativi nelle diverse linee, probabilmente coinvolte nella maggior parte delle funzioni di base; quelle che presentano diversa espressione nei fenotipi differenziati (θ , ζ , L), che possono essere collegate a funzioni linea-specifiche.

LA PKC- θ

L'isoforma θ è stata particolarmente studiata negli ultimi anni, sebbene sia stata scoperta e sequenziata agli inizi degli anni '90 nel tessuto muscolare scheletrico (dove si trova associata al sarcolemma), essa è l'isoforma caratteristica dei tessuti linfoidei (timo e linfonodi) ed ematopoietici, con prevalenza di espressione in linfociti T maturi ($CD4^+$ e $CD8^+$) e piastrine; nel muscolo scheletrico la PKC- θ partecipa alla trasduzione del segnale nelle giunzioni neuromuscolari in via di sviluppo e mature, interviene anche nella regolazione della progressione del ciclo cellulare e dell'organizzazione del citoscheletro nelle cellule endoteliali.

La maggior parte delle informazioni relative a quest'isoforma è stata raccolta dagli studi sui linfociti T; si è scoperto infatti che PKC- θ è coinvolta nel processo di attivazione e nella proliferazione delle cellule T mature, inoltre media selettivamente alcune funzioni essenziali nella segnalazione legata al recettore delle cellule T (TCR), svolgendo così un ruolo chiave non solo nella fase iniziale ma anche negli eventi tardivi della replicazione cellulare.

Nelle cellule T attivate dall'antigene, PKC- θ trasloca in membrana e colocalizza con il recettore nel sito di contatto con l'APC; la stimolazione del TCR induce anche la traslocazione di PKC- θ in membrana, mediata dalla fosforilazione in tirosina del dominio regolatorio dell'enzima dipendente dalla specifica tirosina chinasi Lck (enzima citosolico, appartenente alla famiglia di Src). A seguito di questa fosforilazione, essenziale per la sua azione, PKC- θ attiva NF- κ B, un fattore nucleare coinvolto nella trascrizione del gene per l'interleuchina 2 che è il principale fattore di crescita dei linfociti T.

Un modello proposto suggerisce che l'isoforma θ si trovi nel citosol delle cellule T nella sua forma chiusa ed inattiva, dovuta all'interazione intramolecolare del dominio catalitico con il dominio pseudosubstrato. L'idrolisi dei fosfatidilinositoli e l'esposizione in membrana del DAG, determinerebbe una traslocazione in membrana della chinasi con conseguente attivazione; l'attivazione di PDK1 da parte di PI3K, permetterebbe la fosforilazione di PKC- θ nel suo "loop" di attivazione all'interno del dominio catalitico, portandola alla sua forma cataliticamente attiva. Più recentemente è stato individuato un sito di fosforilazione in tirosina al N-terminale, proprio nel dominio regolatorio, che ne influenzerebbe positivamente l'attività.

PKC- θ nelle linee cellulari

Sebbene molti studi abbiano chiarito il ruolo svolto dall'isoforma θ nelle cellule della linea linfoide, si conosce ancora poco invece sul suo ruolo nelle cellule della linea mieloide.

Diversi lavori presenti in letteratura suggeriscono che l'isoforma θ di PKC possa essere coinvolta nei processi di differenziamento da progenitori mieloidi a megacariociti e piastrine. Inoltre è stato dimostrato che PKC- θ svolge un ruolo importante nella produzione delle piastrine nei megacariociti.

Nella linea cellulare da noi usata come modello, le HEL, la PKC- θ è attiva e viene prodotta in seguito all'induzione del differenziamento con PMA. Inoltre nelle HEL il differenziamento megacariocitico indotto da PMA è accompagnato da modificazioni dell'attività catalitica di PKC e della composizione delle isoforme a livello nucleare; un trattamento acuto con PMA stimola una traslocazione massiva di alcune isoforme (tra cui θ) dal citosol al nucleo, mentre un'esposizione prolungata porta ad una parziale o completa "down-modulation" delle stesse isoforme. Inoltre nel differenziamento dai progenitori CD34⁺ a megacariociti (MK) la PKC- θ risulta essere l'isoforma che subisce l'incremento maggiore di espressione tra gli isoenzimi della famiglia di PKC. Un ulteriore incremento di espressione di PKC- θ si ha anche nel differenziamento da MK a piastrine. In nessuna altra cellula della linea mieloide si osserva un incremento così massivo di PKC- θ suggerendo una certa specificità di questo enzima per la linea megacariocitica.

Tutti questi indizi lasciano spazio all'ipotesi che PKC- θ possa svolgere un ruolo molto importante nel differenziamento lungo la linea megacariocitica di progenitori mieloidi e di linee megacariocitiche come le HEL.

OBIETTIVI

Uno degli scopi del presente lavoro è stato la messa a punto di un modello sperimentale per lo studio del differenziamento di progenitori mieloidi umani lungo la via megacariocitica, che comprendesse l'analisi citofluorimetrica di marcatori del differenziamento, come le glicoproteine di membrana CD41 e CD42, e la poliploidia.

Le difficoltà che si incontrano per allestire colture primarie di progenitori mieloidi CD34⁺ sono enormi, sia perché è molto difficile ottenere campioni di midollo umano da soggetti sani, sia perché i metodi per l'estrazione dal tessuto di cellule così rare sono complessi e spesso di scarso rendimento. Per ovviare a tutti questi problemi si è deciso di utilizzare, per il nostro modello, una linea cellulare eritroleucemica (HEL) che presenta caratteristiche molto simili alle cellule multipotenti progenitrici della linea mieloide. L'utilizzo di questa linea cellulare per studi sul differenziamento megacariocitico è ben noto in letteratura.

Il differenziamento lungo la via megacariocitica è stato indotto trattando le HEL con PMA per 3 giorni, al termine dei quali le cellule sono state contate, marcate ed analizzate al citofluorimetro per lo scattering e l'immunofenotipizzazione. Abbiamo valutato la mortalità e la vitalità delle cellule sottoposte ai diversi trattamenti. Con la microscopia a contrasto di fase sono stati verificati i cambiamenti nella morfologia cellulare dovuti alla stimolazione con PMA. Inoltre, la marcatura con un colorante fluorescente, intercalante degli acidi nucleici, ha permesso di valutare la presenza di sottopopolazioni con corredi cromosomici multipli.

Successivamente abbiamo utilizzato il nostro modello sperimentale per valutare l'influenza dell'isoforma θ di PKC nel processo di differenziamento indotto da PMA, mediante l'inibizione specifica di questo enzima da parte di un peptide pseudosubstrato (θ -PS) miristilato capace di inibire in maniera specifica questa isoforma di PKC.

Diversi lavori presenti in letteratura suggeriscono che l'isoforma θ di PKC possa essere coinvolta nei processi di differenziamento da progenitori mieloidi a megacariociti e piastrine. Inoltre è stato dimostrato che PKC- θ svolge un ruolo importante nella produzione delle piastrine nei megacariociti.

Nella linea cellulare da noi usata come modello, le HEL, la PKC- θ è attiva e viene prodotta in seguito all'induzione del differenziamento con PMA. Inoltre nelle HEL il differenziamento megacariocitico indotto da PMA è accompagnato

da modificazioni dell'attività catalitica di PKC e della composizione delle isoforme a livello nucleare; è noto che un trattamento acuto con PMA stimola una traslocazione massiva di alcune isoforme (tra cui θ) dal citosol al nucleo, mentre un'esposizione prolungata porta ad una parziale o completa "down-modulation" delle stesse isoforme.

Un lavoro recentemente pubblicato su linee cellulari intestinali riporta inoltre di una interazione diretta fra PKC- θ ed i microtubuli; in particolare gli autori dimostrano che questo isoenzima è responsabile della fosforilazione della β -tubulina.

Tutti questi indizi lasciano spazio all'ipotesi che PKC- θ possa svolgere un ruolo molto importante nel differenziamento lungo la linea megacariocitica di progenitori mieloidi e delle HEL, forse mediando il processo di poliploidizzazione attraverso un'interazione con i microtubuli che partecipano al processo endomitotico.

Per verificare queste ipotesi abbiamo valutato l'influenza dell'inibizione dell'isoforma θ di PKC sull'espressione dei marker di differenziamento CD41 e CD42 e sulla poliploidia. Inoltre abbiamo valutato i livelli di espressione della PKC- θ , prima e dopo il differenziamento, e la presenza di interazione con i microtubuli nelle HEL mediante coimmunoprecipitazioni e Western-blot.

METODI

COLTURA CELLULARE

Mantenimento di cellule HEL in coltura

Le HEL sono una linea cellulare eritroleucemica, come tutte le cellule di origine emopoietica crescono in sospensione nel terreno di coltura e sono in grado di moltiplicarsi in vitro senza aderire.

Come terreno di coltura si utilizza RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium 1640) al 15% di FBS (siero fetale bovino), con l'aggiunta di antibiotici e antimicotici e di 2mM L-glutammina; sono fatte crescere in fiasche e mantenute a 37°C nell'incubatore al 5% CO₂, una buona concentrazione per la crescita è di 10⁴-10⁵ cellule per ml. Le cellule devono essere "passate" (cioè risospese in terreno fresco) almeno due volte la settimana: la sospensione cellulare contenuta nella fiasca è suddivisa in falcon che sono centrifugate a 1400 rpm per 5 minuti, tranne una piccola quantità che viene utilizzata per la conta con trypan blue in camera di Bürker. Una volta aspirato il surnatante, i pellets di cellule vengono risospesi con cura in circa 10 ml di terreno completo fresco. Si trasferisce la sospensione di cellule nelle fiasche nelle quali si aggiunge altro terreno per portare le cellule ad una concentrazione di circa 10⁵ cellule per ml idonea alla crescita.

Differenziamento megacariocitico delle HEL

Le HEL sono in grado di differenziarsi sia lungo la linea megacariocitica sia lungo la linea eritroide; infatti, se opportunamente stimolate, possono esporre sulla membrana i markers per entrambi i fenotipi. Per stimolare le HEL lungo la via megacariocitica, le cellule vengono trattate con 100 nM PMA (forbolo miristato acetato), un analogo del DAG, per 72 ore che induce l'espressione dei markers megacariocitici come CD41 e CD42.

Le cellule in coltura vengono contate, centrifugate e portate in terreno completo ad una concentrazione di 10⁶ cell/ml e ad un volume tra i 10 ed i 30 ml. Si allestiscono quattro sottocolture:

- A: HEL + 0.2 µl/ml DMSO;
- B: HEL + 0.1 µl/ml PMA (1 mM) + 0.1 µl/ml DMSO;
- C: HEL + 0.1 µl/ml θPS (1 mM) + 0.1 µl/ml DMSO;
- D: HEL + 0.1 µl/ml PMA (1 mM) + 0.1 µl/ml θPS (1 mM);

PMA e θ PS si prelevano da una soluzione madre ad una concentrazione di 1 mM in DMSO. Le cellule così trattate vengono incubate 72 ore a 37°C e al 5% CO₂. Trascorse le 72 ore le cellule di ciascuna fiasca vengono contate separatamente, lavate due volte in PBS (80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 11.5 g/l Na₂HPO₄, 2 g/l KH₂PO₄, madre 10X, pH 7.3) e risospese alla concentrazione di 10⁶ cellule/ml sempre in PBS. Dopo la marcatura possono essere analizzate al citofluorimetro o al microscopio confocale, oppure lisate con detergenti per l'analisi biochimica.

ANALISI AL CITOFLUORIMETRO

- L'analisi citofluorimetrica viene utilizzata per valutare l'espressione dei markers di differenziamento (immunofenotipizzazione) e per valutare il grado di poliploidia raggiunto alle cellule stimulate.

Immunofenotipizzazione

Vengono preparati sei campioni per ogni popolazione:

- Un campione bianco di controllo;
- Due campioni marcati con Ab anti-CD41 coniugato FITC;
- Due campioni marcati con Ab anti-CD42 coniugato PE;
- Un controllo negativo marcato con Ab anti-Rabbit IgG-FITC;
- Un controllo negativo marcato con Ab anti-Rabbit IgG-PE;

ogni provetta contiene 500 μ l di 10⁶ cellule/ml e 10 μ l di anticorpo, i campioni vengono incubati per 30 minuti al buio a temperatura ambiente; si aggiunge 1 ml di PBS per fermare la reazione e si centrifuga a 800 rpm per 10 minuti, si risospende il pellet in 500 μ l di PBS. Si procede alla lettura dei campioni al citofluorimetro.

Analisi della Poliploidia

- Ad 1 ml di 10⁶ cellule/ml si aggiungono:
- 3 ml di etanolo ghiacciato, goccia a goccia;
- Incubazione overnight a -20°C;
- Aggiunta di 4 ml di PBS;
- Centrifugazione a 1400 rpm per 5 minuti;
- Risospensione del pellet in 1 ml di PBS con 0.1% di glucosio;
- Centrifugazione a 1400 rpm per 5 minuti;
- Risospensione in 1 ml di Propidium Iodide (PI) Staining solution (0.1% sodio citrato, 0.1% Tryton X-100, 10 ng per ml di ioduro di propidio, 0.01% RNAsi);

- Incubazione a temperatura ambiente per 30 minuti;
- Lettura al citofluorimetro.
- Gli ultimi tre passaggi devono essere eseguiti al buio, l'intero protocollo deve essere eseguito in ghiaccio; lo Ioduro di Propidio colora selettivamente il DNA e fornisce indicazioni sul grado di poliploidia delle cellule.

Western blotting

Dopo SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 8% (separating gel: separating buffer 4X 1.875 ml, acqua bidistillata 3.625 ml, acrilammide 2 ml, temed 13 µl, APS 66.5 µl. Stacking gel: stacking buffer 4X 0.625 ml, acqua bidistillata 1.5 ml, acrilammide 0.335 ml, temed 3.75 µl, APS 12.5 µl) si esegue il trasferimento delle proteine su membrana utilizzando il "Semi-dry transfer system". Si preparano diversi foglietti di carta 3 MM delle dimensioni del gel e si immergono in 3 diverse soluzioni: si mette un foglietto nella vaschetta contenente la soluzione anodo 1 (36.342 g/l Tris/HCl pH 10.4, 20% metanolo), due foglietti nella soluzione anodo 2 (3.0285 g/l Tris/HCl pH 10.4, 20% metanolo) e tre foglietti nella soluzione catodo (3.285 g/l Tris/HCl pH 9.4, 20% metanolo); viene tagliato un foglietto di polivinilidene difluoruro (PVDF) delle stesse dimensioni del gel e viene prima bloccato in metanolo e, dopo tre lavaggi in acqua bidistillata (per eliminare il metanolo), messo nella soluzione catodo. Sulla superficie dell'apparecchio si stratificano i diversi foglietti, la membrana di PVDF, ed il gel. Il trasferimento avviene ad amperaggio costante (0.2 Ampere per un minigel) per 15 minuti al termine del quale la membrana è bloccata nuovamente in metanolo, asciugata all'aria per circa 30 minuti e messa in presenza dell'anticorpo primario o in TBS-Tween (TBS 1X: 6.055 g/l Tris, 7 g/l NaCl, pH 7.4; 0.1% di Tween 20).

Per un minigel 8% (spessore 1 mm).

Immunoblotting

Per rendere visibili le bande di interesse, la membrana è prima marcata con un anticorpo primario e poi con anticorpi coniugati con HRP (Horse Raddish Peroxidase). per 1 ora a temperatura ambiente su piattaforma basculante. Quindi si effettuano 3 lavaggi in TBS-Tween 0.1% da 15 minuti; finiti i lavaggi si aggiunge l'anticorpo secondario. L'anticorpo secondario coniugato è messo in presenza della membrana per 45 minuti. Terminata la seconda marcatura, si fanno ancora 3 lavaggi da 15 minuti in TBS-Tween 0.1%; si incuba la membrana per circa 30 secondi a temperatura ambiente

con il substrato della perossidasi al buio; per il rivelamento si usa il “Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus” (PerkinElmer).

Stripping: la membrana viene immersa nel “Restore Western Blot Stripping Buffer” (Pierce) per 5-15 minuti a temperatura ambiente, la membrana viene lavata (3 lavaggi ogni 5 minuti) con TBS-Tween, messa in metanolo e fatta asciugare. Terminato lo stripping la membrana è pronta per essere nuovamente marcata.

Immunoprecipitazione

Si lisano i campioni aggiungendo un uguale volume di IP buffer 2x (Tris-HCl 100 mM, NaCl 200 mM, EGTA 2 mM, NP-40 2%, glicerolo 20%, Na deossicolato 0.5%), al quale prima dell'uso si aggiungono: inibitori delle proteasi (SIGMA mix già pronto, da conservare a -20°C), inibitori delle tirosin-fosfatasi NaF 2mM e Na_3VO_4 2mM. Si incuba in ghiaccio per 15-20 minuti (agitando spesso su vortex), si centrifuga a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C .

Si effettua la quantificazione delle proteine contenute nei lisati per immunoprecipitare da un'uguale quantità di proteine in tutti i campioni.

Si aggiungono al surnatante 1-3 microgrammi di anticorpo diretto contro la proteina da purificare.

Incubazione in camera fredda over-night (su ruota).

I campioni sono centrifugati a 13000 rpm a 4°C per eliminare eventuali precipitati.

Recuperato il surnatante, si aggiunge la resina sefaroso coniugata con la proteina A o la proteina G (a seconda del tipo di anticorpo utilizzato).

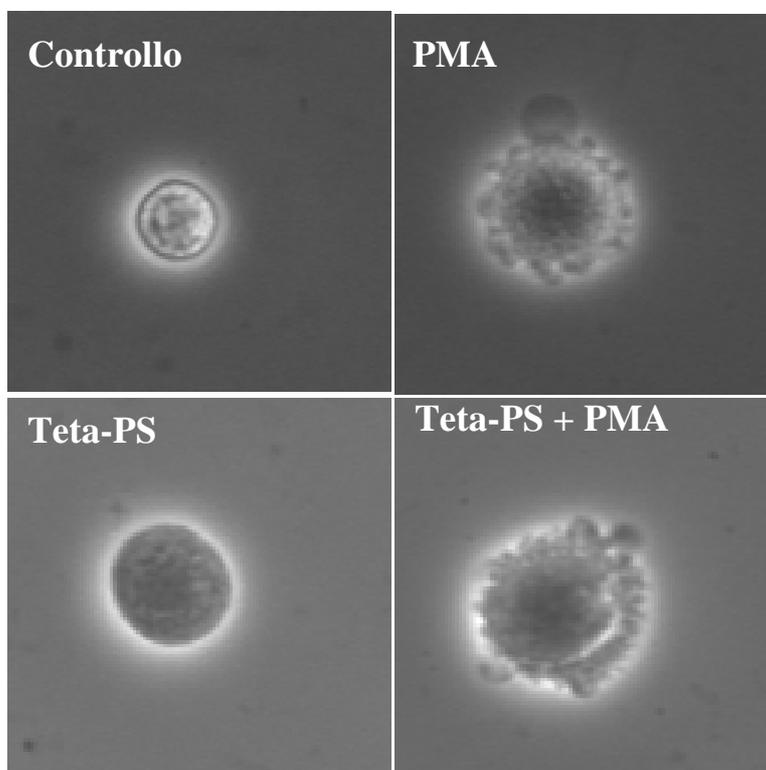
Si lasciano i campioni in incubazione su ruota a 4°C per 45 minuti; si centrifuga a 13000 rpm per 2 minuti a 4°C . Vengono recuperati i surnatanti e gli immunoprecipitati sono lavati per 3 volte con IP buffer 1X. Si porta a secco la resina con una siringa, i campioni sono denaturati aggiungendo Laemmly buffer e posti a 96°C per 5 minuti.

RISULTATI

MICROSCOPIA A CONTRASTO DI FASE

Le HEL sono cellule che crescono in sospensione, se osservate al microscopio appaiono di forma tondeggiante e con una superficie cellulare regolare. In figura 1 sono riportate le immagini di cellule fissate in paraformaldeide ed osservate con il microscopio a contrasto di fase. La spinta al differenziamento causata dal trattamento delle cellule con PMA per 72 ore è in grado di indurre le HEL a cambiare la propria morfologia. In figura 1 si può osservare come le cellule trattate con PMA abbiano perso parzialmente la forma sferica per acquisire la tipica forma stellata delle cellule attivate; la superficie cellulare non appare più liscia e ben definita, ma compaiono protrusioni simili a pseudopodi. L'inibizione di PKC- θ mediante l'uso del peptide pseudosubstrato non altera la morfologia cellulare in maniera apprezzabile rispetto alle cellule senza inibitore come risulta evidente confrontando i due pannelli inferiori con i due superiori di figura 1.

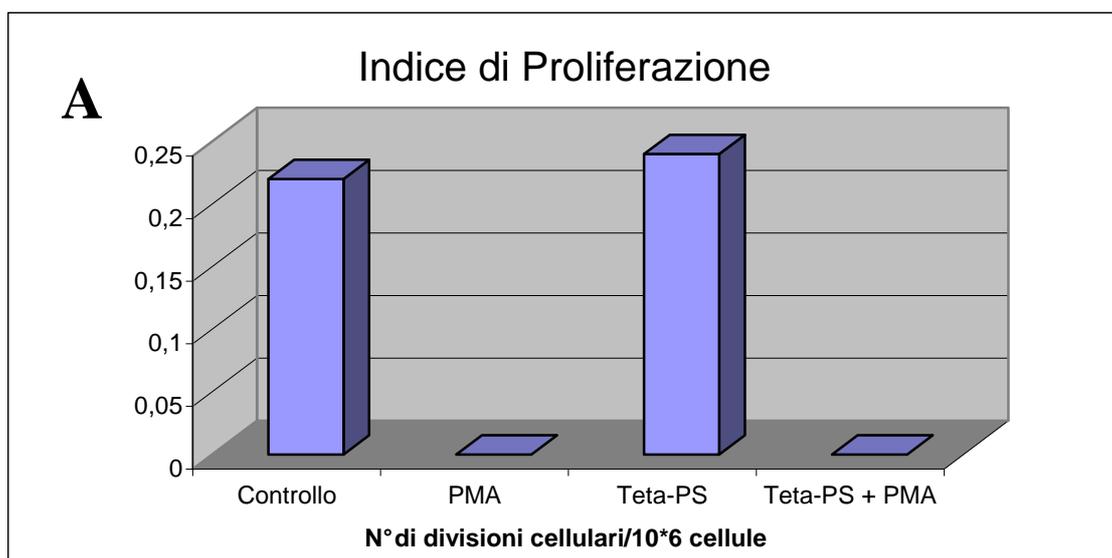
Figura 1



VITALITÀ E MORTALITÀ

Fiasche contenenti 10^6 cellule/ml sono state trattate con 0.0001% DMSO (cellule di controllo), 100 nM PMA, 100 nM tetra-PS e 100 nM PMA + 100 nM tetra-PS, per 72 ore, al termine delle quali le cellule sono state contate in camera di Bürker in presenza di trypan blue. Dal conteggio ottenuto sono stati ricavati l'indice di proliferazione cellulare, inteso come numero di nuove divisioni cellulari verificatesi nelle 72 ore di incubazione per ogni milione di cellule, e l'indice di mortalità, inteso come il numero di cellule morte per ogni milione di cellule messe a incubare per 72 ore. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 1 e gli indici riportati sono stati calcolati partendo dalle medie dei valori ottenuti da 5 diversi esperimenti. Nel grafico riportato in figura 2A si evidenzia come le cellule non differenziate continuino a proliferare nei tre giorni di incubazione, in particolare si osservano dalle 22×10^4 alle 24×10^4 nuove divisioni cellulari per ogni 10^6 cellule. Al contrario, le cellule indotte al differenziamento con PMA non solo smettono di proliferare (indice di proliferazione = 0), ma, come mostrato in figura 2B, circa la metà delle cellule messe in coltura con PMA iniziano un processo di morte cellulare.

Figura 2



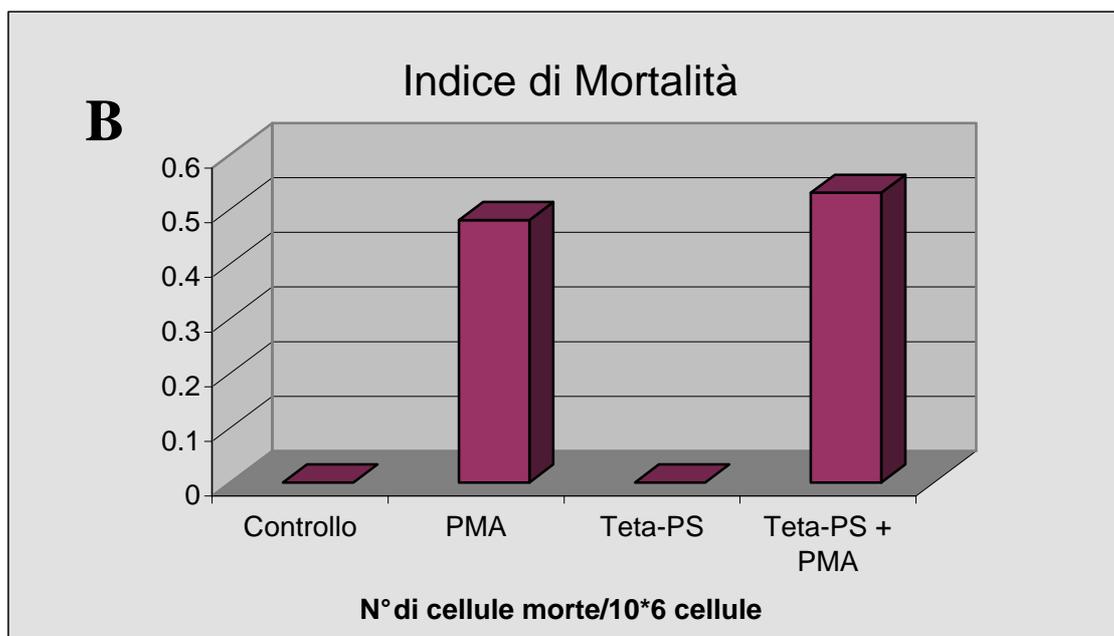


Tabella 1

	Proliferazione	Mortalità
Controllo	0.22 ± 0.01*	0
PMA	0	0.48 ± 0.06*
Teta-PS	0.24 ± 0.06*	0
Teta-PS + PMA	0	0.53 ± 0.06*

* Deviazione Standard

L'inibizione di PKC- θ ottenuta attraverso l'incubazione delle cellule con il peptide pseudosubstrato miristilato tetra-PS non influenza in maniera significativa né la proliferazione cellulare né la mortalità. Le cellule trattate con tetra-PS da solo o con tetra-PS in presenza di PMA non mostrano variazioni di rilievo rispetto agli stessi campioni in assenza dell'inibitore.

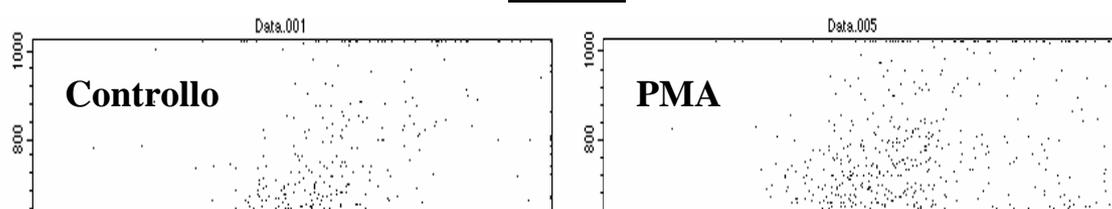
ANALISI AL CITOFLUORIMETRO

Scattering

I campioni di cellule (10^6 cellule/ml) stimolati con PMA 100 nM o con DMSO (0.0001%) per 72 ore sono stati preparati per l'analisi al FACS come descritto nei materiali e metodi. La figura 3 riporta un'analisi della popolazione di cellule stimolate con PMA e di cellule di controllo in termini di dimensioni (FSC) e di complessità (SSC) del citoplasma. In tabella 2 sono riportati i dati relativi alla media di cinque esperimenti delle medie geometriche delle dimensioni e della complessità della popolazione considerata per l'analisi (cerchiata in rosso nei grafici). Le medie geometriche del valore SSC di campioni di cellule stimolati con PMA differiscono in maniera significativa (Test T, $p < 0.01$) rispetto alle cellule di controllo. Non si riscontrano invece differenze significative tra le popolazioni di cellule trattate e cellule di controllo per quello che riguarda le medie geometriche del valore FSC. Le linee blu presenti nei grafici di figura 3 indicano il valore medio di SSC della popolazione e mettono in evidenza, come il trattamento con PMA induca un aumento nella complessità delle cellule senza alterarne sensibilmente le dimensioni.

L'uso del peptide substrato di PKC- θ non sembra influenzare in alcun modo lo scattering della popolazione. Non si evidenziano differenze statisticamente significative sia tra i campioni di cellule trattate con il peptide e quelli di controllo, sia tra i campioni indotti al differenziamento con PMA in presenza dell'inibitore teta-PS ed i campioni trattati con solo PMA. Al contrario le cellule trattate con PMA in presenza dell'inibitore mostrano un incremento significativo (Test T, $p < 0.01$) rispetto alle cellule trattate con il solo inibitore paragonabile a quello indotto dal solo PMA rispetto alle cellule di controllo.

Figura 3



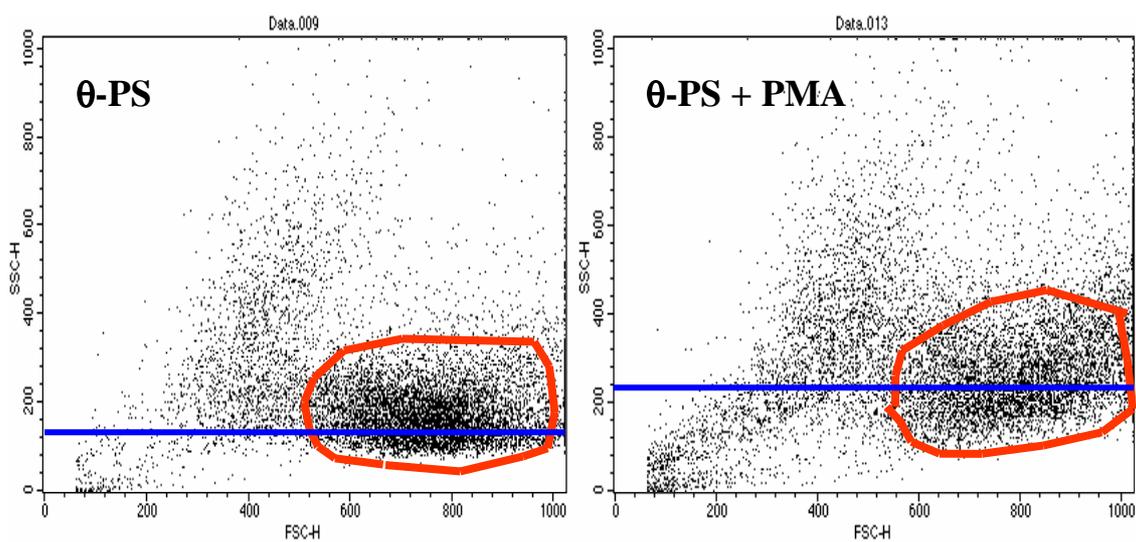


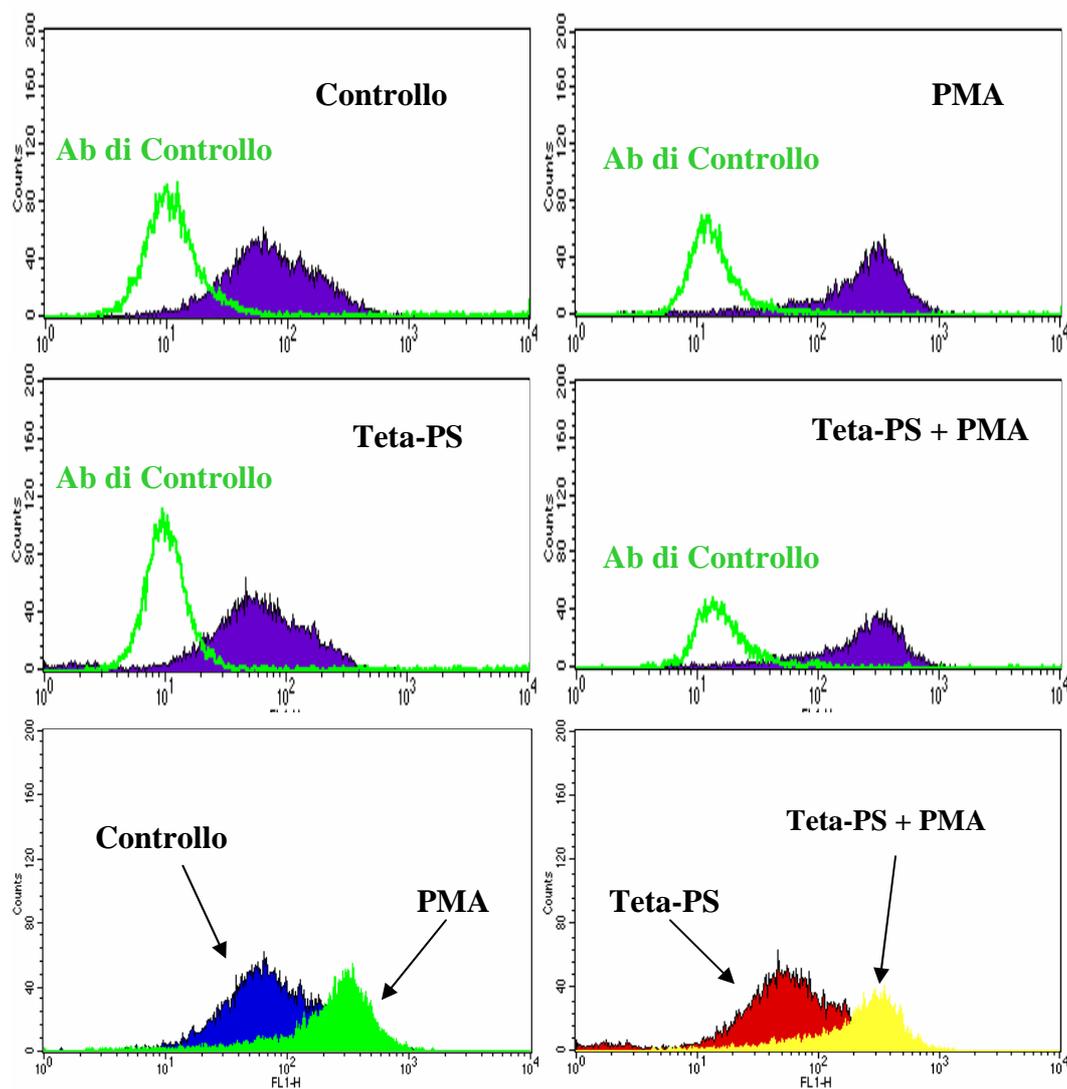
Tabella 2

	Dimensioni (media geometrica)	Complessità (media geometrica)
Controllo	649.01 ± 26.2*	157.02 ± 30.8*
PMA	709.45 ± 60.2*	244.22 ± 51.5*
θ-PS	687.63 ± 49.3*	158.33 ± 25.5*
θ-PS + PMA	688.69 ± 46.7*	244.86 ± 47.0*

* Deviazione Standard

Le stesse cellule utilizzate per la caratterizzazione dello scattering sono state marcate con un anticorpo monoclonale anti-CD41 coniugato FITC ed analizzate utilizzando il canale per la fluorescenza FL1, in grado di eccitare il fluorocromo FITC il quale emette fluorescenza nel verde. In figura 4A è riportato il grafico che illustra la distribuzione della fluorescenza nelle popolazioni di cellule stimulate e di controllo in cui è evidente uno spostamento della curva di distribuzione verso intensità maggiori di fluorescenza nella popolazione di cellule indotte a differenziare. Infatti, sebbene il CD41 risulti già espresso nelle HEL non trattate, lo stimolo con PMA è in grado di incrementare l'espressione di questo marker di differenziamento. Come controllo per la fluorescenza nel verde è stato utilizzato un anticorpo monoclonale coniugato FITC e diretto contro il frammento FC delle IgG di coniglio (figura 4C).

Figura 4A



L'analisi dei dati ottenuti da diversi esperimenti eseguiti alle medesime condizioni sperimentali è riportata in tabella 3. E' importante osservare che nelle cellule trattate con PMA l'espressione del CD41 è più che raddoppiata rispetto alle cellule di controllo (Test T, $p < 0.01$), ed un incremento di analoga intensità si osserva nelle cellule trattate con tetra-PS (Test T, $p < 0.01$). L'inibizione di PKC- θ tuttavia non modifica l'espressione del CD41 sulla superficie cellulare delle HEL, non vi sono infatti differenze significative tra cellule di controllo e cellule trattate con tetra-PS e tra le cellule trattate con PMA e quelle trattate con PMA e tetra-PS.

CD 42

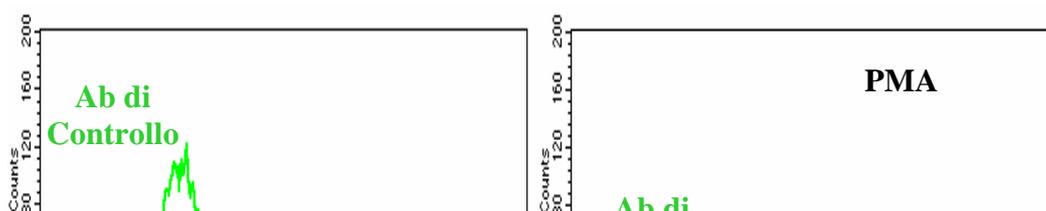
Con un procedimento analogo al CD 41, le cellule sono state marcate con un anticorpo monoclonale anti-CD42 coniugato PE e lette al citofluorimetro rilevando la fluorescenza rossa emessa dal fluorocromo eccitato, utilizzando il canale FL-2. In figura 4B sono riportate le curve di distribuzione dell'espressione del CD 42 sulla superficie cellulare; dopo 72 ore di incubazione dalla stimolazione, non si apprezzano significativi aumenti della fluorescenza tra le cellule di controllo e quelle stimolate con PMA, si può, inoltre, notare che l'incubazione di 72 ore delle cellule, in presenza di un peptide pseudosubstrato inibente la PKC- θ , non influenza l'espressione di questo marcatore di differenziamento nelle HEL, i valori rimangono pressoché costanti nelle quattro popolazioni. Come controllo per la fluorescenza nel rosso è stato utilizzato un anticorpo monoclonale coniugato PE e diretto contro il frammento FC delle IgG di coniglio.

Tabella 3

	Controllo	PMA	teta-PS	teta-PS +PMA
CD41	71.87± 13.2*	157.88± 27.5*	66.03± 16.0*	154.8± 21.8*
Ab di controllo -FITC	4.94± 0.9*	7.34± 1.4*	4.22± 0.3*	7.34± 1.2*
CD42	5.6± 0.5*	10.5± 3.6*	5.45± 0.5*	8.6± 3.1*
Ab di controllo -PE	6.6± 1.3*	8.7± 0.6*	5.39± 0.2*	8.9± 0.8*

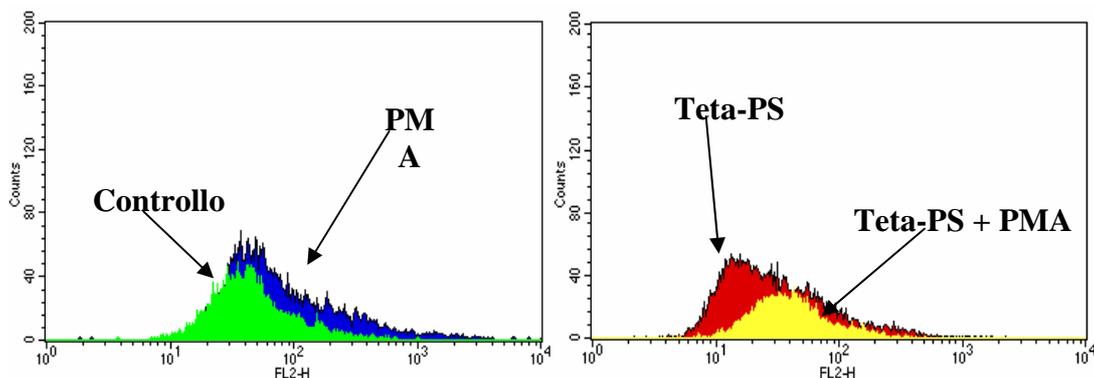
* Deviazione Standard

Figura 4B



Controllo

Teta-PS



Tuttavia è necessario osservare che le curve riportate in figura 4B, contrariamente a quelle riportate in figura 4A, sono sovrapponibili alle curve dell'anticorpo di controllo. In figura 4C ed in figura 4D sono riportati i grafici di confronto tra le marcature con gli anticorpi anti CD41 ed anti CD42 ed i rispettivi anticorpi di controllo. Come si può facilmente osservare in figura 4C, l'intensità di fluorescenza delle cellule marcate con l'anticorpo anti CD41 differisce sempre in maniera significativa dall'intensità di fluorescenza delle cellule marcate con l'anticorpo di controllo (T Test: $T < 0,01$). Al contrario, il grafico di figura 4D mette in evidenza la mancanza di differenze significative tra le intensità di fluorescenza delle cellule marcate con anticorpo anti CD42 e quelle marcate con il solo anticorpo di controllo.

Figura 4C

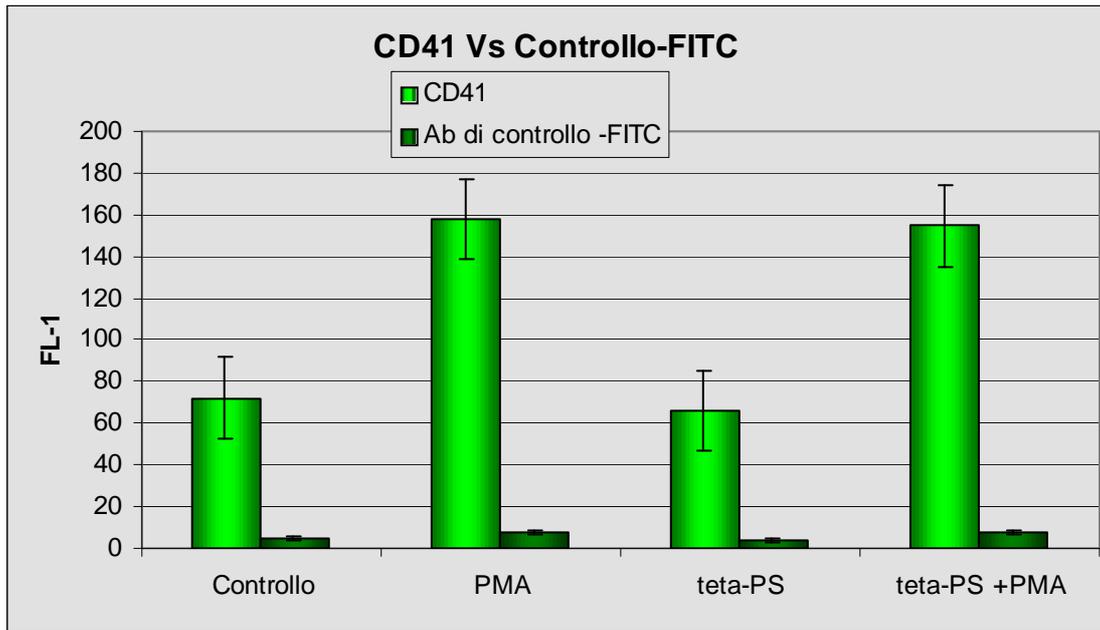
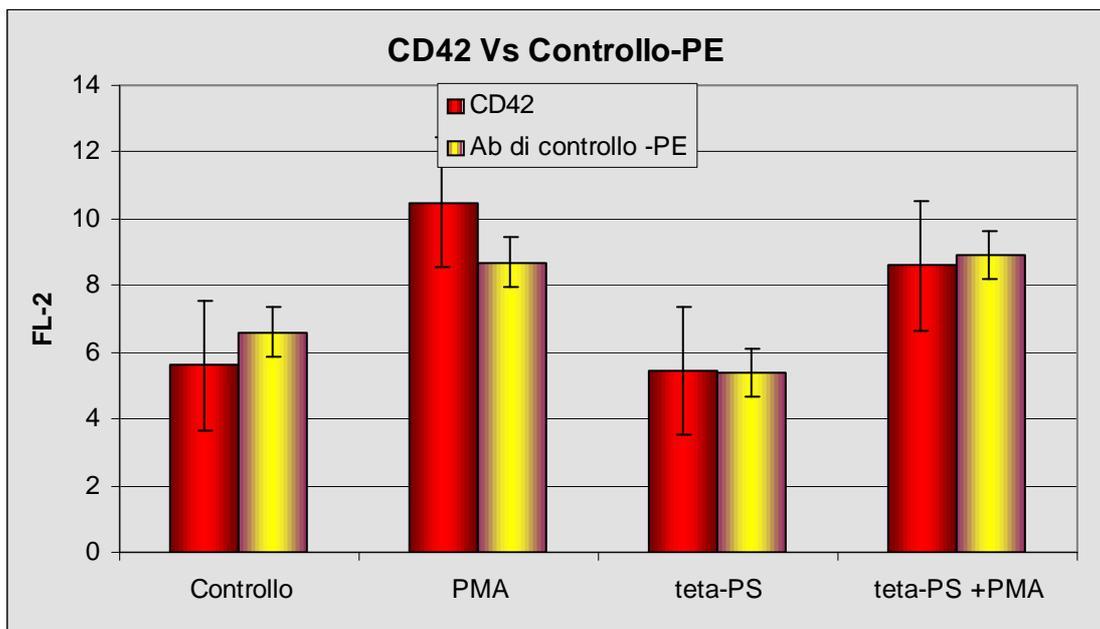


Figura 4D



Cellule messe in coltura per 3 giorni in presenza di PMA, tetra-PS e tetra-PS e PMA, sono state trattate secondo il protocollo per la poliploidia riportato metodi. Per selezionare la popolazione per l'analisi al citofluorimetro sono state utilizzate cellule non permeabilizzate trattate con Ioduro di Propidio: la popolazione così selezionata non prende in considerazione le cellule eventualmente morte durante la preparazione dei campioni per l'analisi. I risultati ottenuti da 5 diversi esperimenti sono riportati in figura 5.

Figura 5A

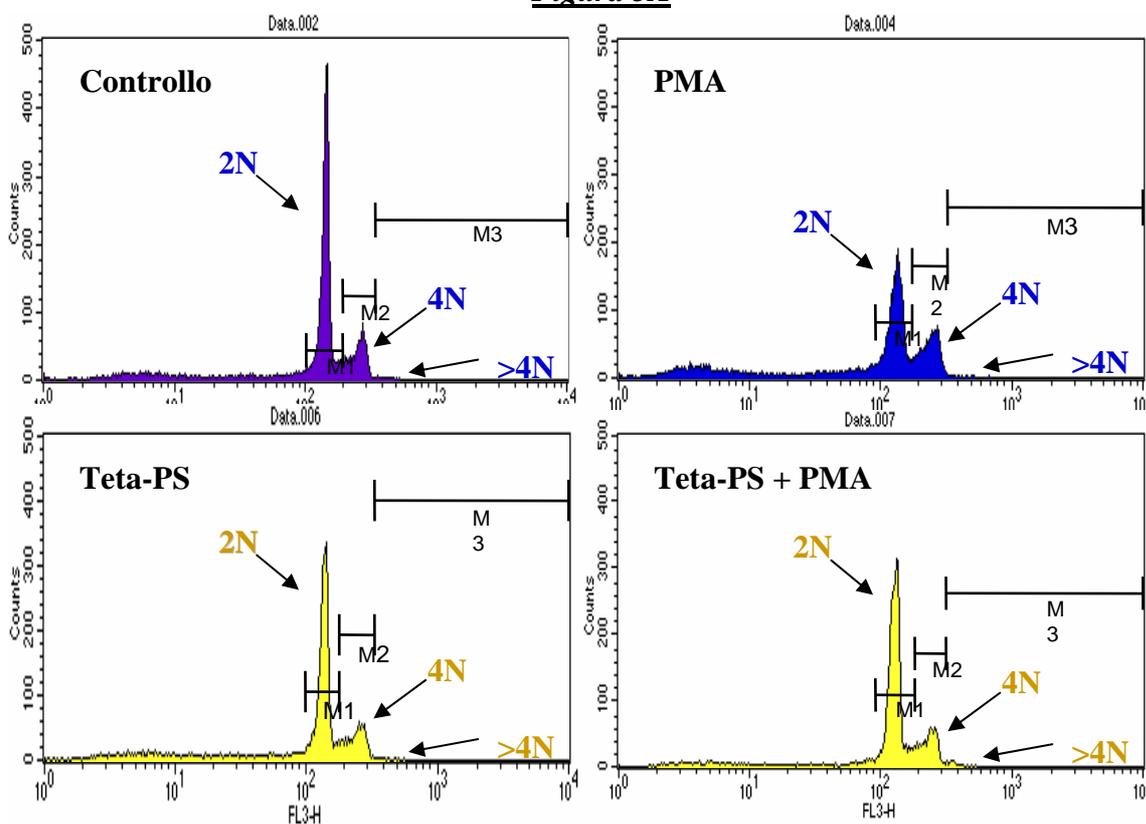


Figura 5A raffigura alcuni grafici rappresentativi dei tipici tracciati che si ottengono con questa analisi. Il primo picco, sulla sinistra nell'asse delle x, corrispondente a cellule con relativamente bassa intensità di fluorescenza in FL3, rappresenta il numero di cellule con corredo cromosomico 2N; il secondo picco di intensità maggiore rappresenta le cellule con corredo cromosomico 4N; gli eventi con intensità di fluorescenza maggiori di 4N si ritrovano alla destra di quest'ultimo. I dati sono stati raccolti e sono state calcolate le percentuali di eventi presenti in ciascun picco rispetto al numero di eventi totali: le medie di queste percentuali sono riportate in tabella 4 e riportate sottoforma di istogramma in figura 5B e 5C.

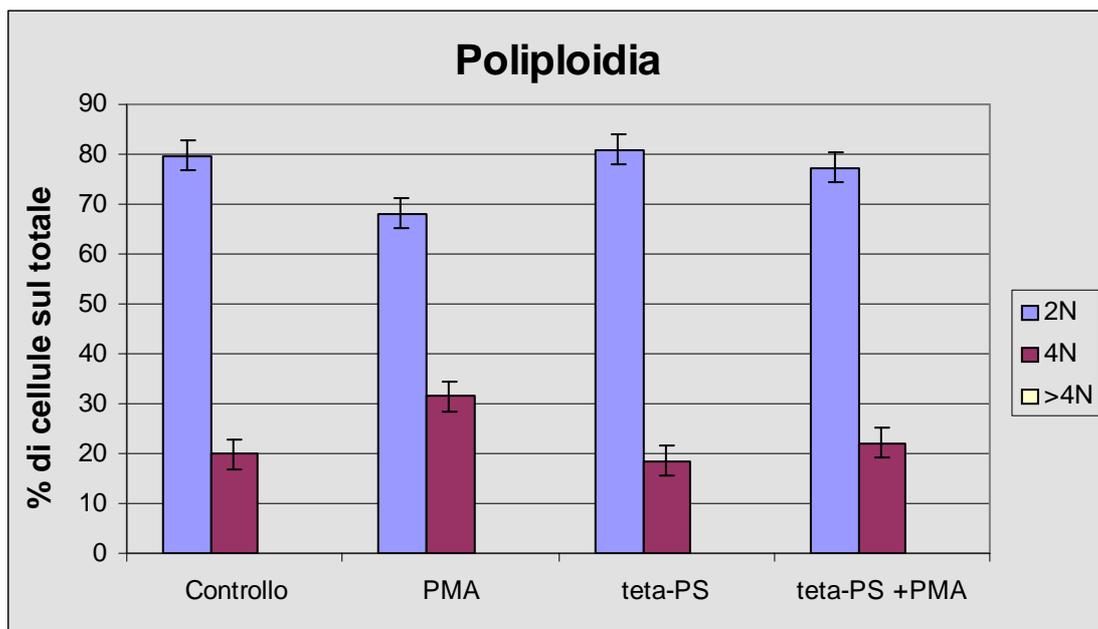
Tabella 4

%	Controllo	PMA	teta-PS	teta-PS +PMA
2N	79.71 ± 3.3*	68.1 ± 2.7*	81 ± 2.8*	77.4 ± 3.0*
4N	19.94 ± 3.1*	31.44 ± 2.8*	18.48 ± 2.9*	22.08 ± 3.2*
>4N	0.003 ± 0.001*	0.006 ± 0.003*	0.005 ± 0.004*	0.005 ± 0.005*

*Deviazione standard

Nei grafici di figura 5A si noti come il trattamento con PMA riduce di circa il 15% l'altezza del picco delle cellule 2N ed aumenta di più del 30% quello delle 4N: in altre parole questo significa che circa il 12% delle cellule, dopo stimolazione con PMA, raddoppia il proprio corredo cromosomico passando da diploidi a tetraploidi. Il trattamento con il peptide pseudosubstrato non induce variazioni significative nella distribuzione dei picchi e nella percentuale di cellule 2N e 4N rispetto alle cellule di controllo. E' interessante osservare invece che l'altezza dei picchi rappresentati in figura 5A e le relative percentuali delle cellule indotte al differenziamento con PMA in presenza dell'inibitore di PKC- θ non mostrano differenze significative rispetto alle cellule trattate con il solo teta-PS ed alle cellule di controllo. Inoltre si apprezzano differenze significative tra i campioni trattati con PMA con o senza inibitore (Test T: $p < 0,05$), indicando che il trattamento con teta-PS è in grado di inibire il processo di poliploidizzazione indotto dal PMA. Questo effetto inibitorio sulle endomitosi è messo in evidenza dal calcolo del "Indice di poliploidia" che corrisponde al rapporto tra le medie delle percentuali delle cellule 4N e le medie delle percentuali delle cellule con normale corredo cromosomico 2N moltiplicato per 100 (dati riportati in tabella 5). I valori degli indici di poliploidia delle cellule sottoposte ai vari trattamenti sono riportati in tabella 5 e riportati sottoforma di istogramma in figura 5D. Gli istogrammi colorati in rosso sono riferiti ai dati provenienti dall'analisi delle cellule trattate con PMA. Si può facilmente osservare come il PMA sia in grado di aumentare l'indice di poliploidia nelle cellule rispetto al controllo. Tuttavia questo incremento indotto dal PMA risulta completamente bloccato dalla inibizione dell'isoforma θ di PKC con il teta-PS.

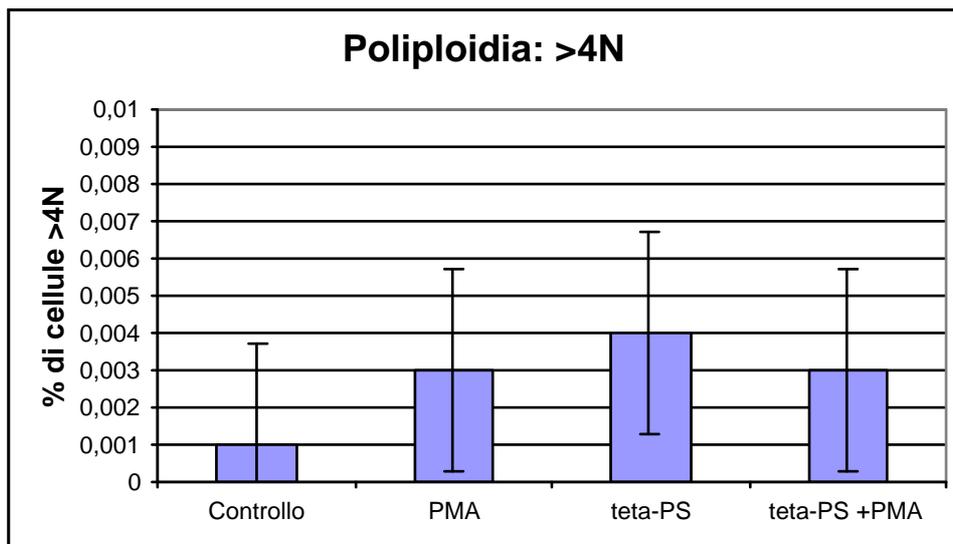
Figura 5B



*Errore medio standard

In figura 5C sono riportati gli istogrammi relativi ai dati riportati in tabella 4 riguardanti le cellule con corredo cromosomico superiore a 4N. Si può facilmente osservare che la percentuale di queste cellule oltre che essere molto bassa, non varia in maniera significativa a seguito dei diversi trattamenti, suggerendo che, nella nostra linea cellulare, il PMA non è in grado di indurre le cellule a corredi cromosomici superiori a 4N.

Figura 5C



*Errore medio standard

Figura 5D

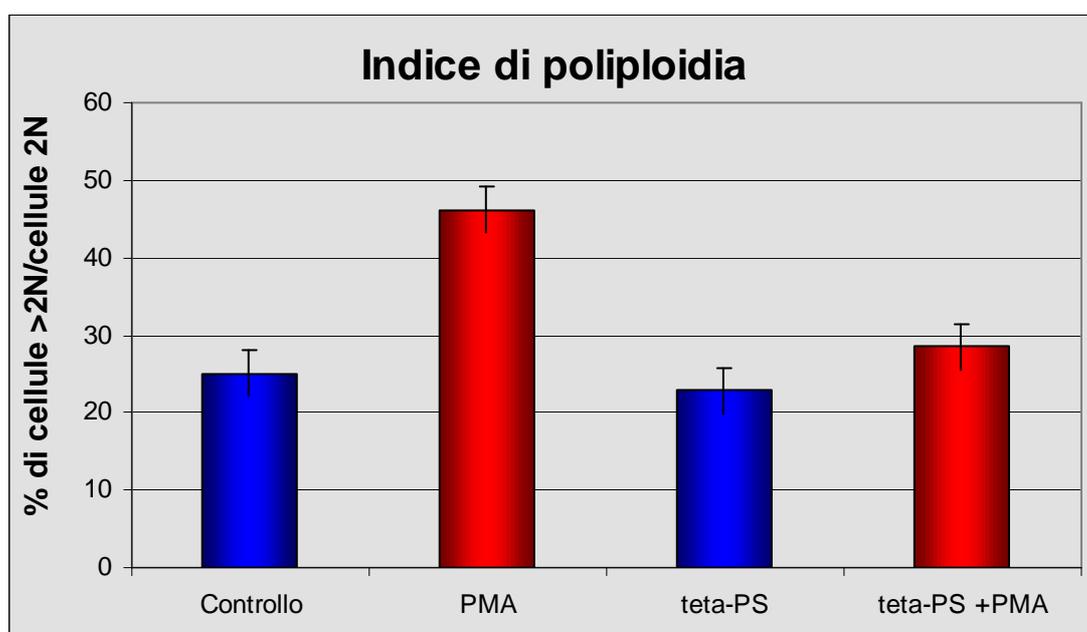


Tabella 5

Controllo	PMA	teta-PS	teta-PS +PMA
25.01	46.17	22.8148	28.53

Errore Medio Standard = 2.99

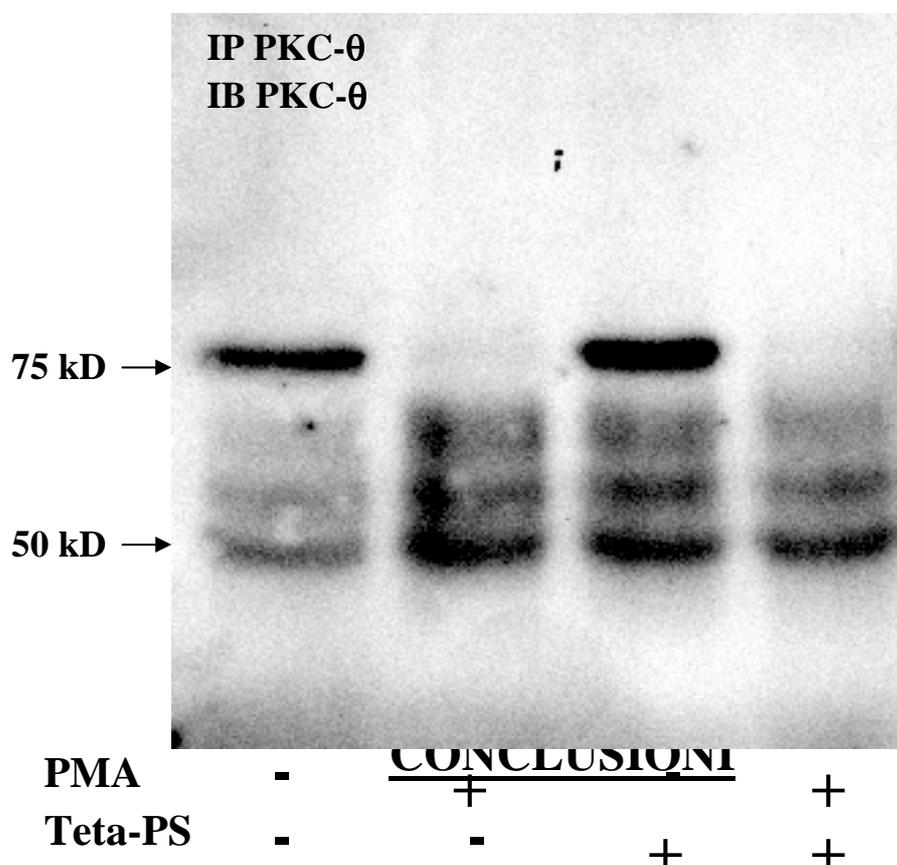
ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI PKC- θ

Cellule messe in coltura per 3 giorni in presenza di PMA, teta-PS e teta-PS e PMA, sono state lisate ed immunoprecipitate con un anticorpo policlonale diretto contro la porzione c-terminale della PKC- θ . Gli immunoprecipitati sono stati separati in SDS-PAGE, trasferiti su membrana e marcati con un anticorpo monoclonale anti PKC- θ .

L'analisi in Western-blot riportata in figura 6 è rappresentativa di tre esperimenti distinti e svolti alle medesime condizioni. Nel primo e nel terzo "lane" è ben visibile la banda di PKC- θ nella sua forma classica di 80 kD, tuttavia negli immunoprecipitati di PKC- θ sono presenti forme di PKC- θ di peso molecolare diverso da quello atteso, rappresentate da tre bande del peso approssimativo di 50, 60 e 70 kD.

Dal confronto tra il primo ed il secondo lane di figura 6, risulta evidente che il trattamento per 3 giorni con PMA induce una totale inibizione dell'espressione della forma classica di PKC- θ di 80 kD. Tuttavia è rilevabile un incremento di tutte e tre le forme di peso molecolare inferiore nei campioni con PMA rispetto ai campioni di controllo. Il trattamento con teta-PS sembra aumentare in maniera rilevante l'espressione di tutte e quattro le forme di PKC- θ , mentre il peptide inibitore non sembra interferire con la "down-regolazione" della forma a 80 kD indotta dal PMA; infatti anche in questi campioni scompare la banda ad 80 kD ma non si percepisce alcun incremento di intensità delle bande a peso molecolare inferiore.

Figura 7



L'obiettivo principale del presente lavoro è stato la messa a punto di un modello sperimentale per lo studio del differenziamento di progenitori mieloidi umani lungo la via megacariocitica e l'analisi citofluorimetrica di marcatori del differenziamento, come le

glicoproteine di membrana CD41 e CD42, e la poliploidia.

Nell'intento di perseguire questo obiettivo abbiamo eseguito un gran numero di esperimenti atti a verificare l'effettivo "shift" differenziativo indotto dal trattamento con PMA per 72 ore nella linea cellulare utilizzata come modello, le HEL, lungo la via megacariocitica.

L'analisi di questa linea cellulare al microscopio a contrasto di fase ha effettivamente evidenziato un cambio nella morfologia cellulare indotto da PMA, che essenzialmente consta della perdita della forma sferica e della emissione di pseudopodi. Si tratta di un fenotipo vicino a quello delle cellule che subiscono "spreading", ma che non può essere paragonato allo "spreading" vero e proprio in virtù del fatto che le cellule sono state stimulate in sospensione e non in adesione ad un substrato. In ogni caso, una morfologia di questo tipo riflette essenzialmente un differenziamento verso la via megacariocitica indotto da PMA, opposto a quello eritrocitico in cui le cellule mantengono una forma sferica.

L'analisi dello scatter al citofluorimetro, però, ci ha indicato che questo cambiamento di morfologia non corrisponde necessariamente ad un aumento sensibile delle dimensioni cellulari, ma solo ad un incremento della complessità cellulare, forse dovuta ad un aumento della cromatina, conseguente al fenomeno di poliploidizzazione, ed a riarrangiamenti citoscheletrici.

Abbiamo inoltre verificato, com'era atteso, che le cellule stimulate con PMA smettono di proliferare ad indicare una perdita dello stato indifferenziato. Inoltre il PMA, com'è noto, induce morte cellulare dovuta anche alla sua azione differenziativa.

L'analisi citofluorimetrica dei marcatori ci ha dimostrato che le nostre cellule sono in grado, una volta indotte a differenziare, di aumentare l'espressione dell'integrina α IIb β III, che è un tipico marcatore di piastrine e megacariociti. α IIb β III è risultata essere già espressa dalle HEL non stimulate, tuttavia dopo 3 giorni di stimolazione, la sua espressione risulta perlomeno raddoppiata. Al contrario di quanto riportato in un articolo pubblicato nel 1996 da Zauli et al, le nostre HEL non esprimono la glicoproteina Ib ed il trattamento con PMA non è in grado di indurre l'espressione. I nostri risultati sono compatibili però con quelli pubblicati da Tabilio et al, i quali affermano che solo una piccolissima percentuale di queste cellule è in grado di esprimere la GP Ib in seguito a stimolazione. Inoltre un lavoro pubblicato nel 1992 da Rajagopalan e colleghi, sull'autorevole rivista "Blood", dimostra che l'espressione della Gplb nelle HEL non è indotta da PMA e da IL-2, ma solo in seguito a trattamento con TNF- α , il fattore di necrosi tumorale α . E' coerente pensare che il nostro metodo non sia in grado di rilevare in maniera significativa minime variazioni di espressione di questa glicoproteina. Peraltro, Kieffer e colleghi hanno dimostrato che la Gplb è presente nelle HEL in una forma incompleta e glicosilata in maniera anomala. Un'altra ipotesi, che non esclude la precedente, potrebbe essere quella di considerare il CD41 o Gplb un marcatore di maturazione cellulare e non di differenziamento. Dati preliminari da noi ottenuti hanno messo in evidenza un aumento di espressione di questa glicoproteina in campioni stimolati sempre con PMA per 3 giorni e lasciati in cultura fino a 7 giorni.

Un altro marker di differenziamento che è stato preso in considerazione per la messa a punto del nostro metodo è stata la poliploidia. Una caratteristica che rende unici i megacariociti ed i megacarioblasti è proprio quella di essere le uniche cellule dell'organismo ad essere poliploidi. Il numero di cromosomi contenuti nel nucleo aumenta man mano che la cellula progenitrice matura ed un megacariocita maturo arriva a possedere un corredo cromosomico superiore 100 N. Quindi, tra le caratteristiche che contraddistinguono una cellula che si differenzia lungo la linea megacariocitica, una delle più importanti è sicuramente quella di poliploidizzare. Per questo motivo abbiamo ritenuto importante sviluppare un metodo che ci permettesse di valutare il grado di poliploidia delle HEL, utilizzando un colorante nucleare fluorescente ed un particolare set-up del

citofluorimetro, differente da quello utilizzato per gli altri marker. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il trattamento con PMA è in grado di aumentare significativamente il grado di poliploidia della linea cellulare da noi considerata: le cellule avviate al differenziamento presentano con maggior frequenza corredi cromosomici maggiori di 2N rispetto alle cellule non indotte al differenziamento. Tuttavia, nella linea cellulare utilizzata per questi esperimenti, in seguito a stimolo con PMA, le cellule diploidi diminuiscono, aumentano significativamente le cellule con corredo cromosomico 4N ma non compare un numero significativo di cellule con corredi cromosomici superiori. Questo indizio suggerisce che le HEL sono solo in grado di iniziare il processo differenziativo, di arrivare cioè ad uno stadio paragonabile a quello delle cellule CFU-meg, ovvero ad un livello simile a quello dei progenitori della linea megacariocitica.

La seconda parte del lavoro ha riguardato l'utilizzo del nostro sistema sperimentale per valutare l'influenza di una isoforma di PKC, PKC- θ , nel processo di differenziamento megacariocitico. A questo scopo abbiamo inibito PKC- θ con un peptide substrato miristilato, specifico per questa isoforma e ne abbiamo valutato gli effetti sull'espressione della PKC- θ stessa, del CD41, del CD42 e sulla poliploidia.

L'analisi dell'espressione di questo enzima in Western-blot ha subito evidenziato che PKC- θ è presente nelle HEL in più forme di pesi molecolari diversi e che il trattamento con PMA per 3 giorni è in grado di variarne l'espressione, sia dal punto di vista qualitativo, che dal punto di vista quantitativo. Di particolare importanza risulta la scomparsa della forma classica di PKC- θ di 80 kD nelle cellule trattate con PMA per 72 ore. Gli indizi raccolti dalla letteratura ci suggeriscono l'ipotesi che, nelle HEL, nelle ore successive all'aggiunta del PMA, le cellule incrementino la trascrizione dell'enzima e la sua attività, per poi "down-modularlo" successivamente, fino a farlo scomparire del tutto dopo 3 giorni. Si potrebbe quindi pensare che PKC- θ sia fondamentale per lo "switch" differenziativo, ma non per la maturazione, anche se purtroppo queste rimangono mere speculazioni che necessitano di ulteriori conferme sperimentali.

La presenza in queste cellule di forme di PKC- θ di peso molecolare inferiore è una novità. Tuttavia la presenza di forme di diverso peso molecolare di questo isoenzima in altri tipi cellulari, sono riportate in letteratura. Inoltre anche nelle piastrine ci è stato possibile dimostrare la presenza di una PKC- θ di 50 kD, con localizzazione e comportamento simili a quello della forma ad 80 kD. Si può ipotizzare che questa forma di peso molecolare inferiore (50 kD) sia la PKC- θ II, una forma scoperta di recente nel testicolo, che è pressoché identica, nella sequenza, alla forma più pesante ma che manca di una porzione dell'N-terminale, in cui è presente invece solo una brevissima sequenza amminoacidica caratteristica di questa forma tronca. Gli anticorpi da noi utilizzati per l'immunoprecipitazione e l'immunoblotting, sono entrambe anticorpi che riconoscono una sequenza posta al C-terminale dell'enzima e per questo non sono in grado di discriminare tra le due forme.

Le forme di circa 60 e 70 kD potrebbero essere forme immature dell'enzima, che dopo essere stato attivato viene degradato per essere sostituito da altra PKC- θ neoprodotta. Un'altra possibilità è che,

dopo stimolo con PMA, PKC θ subisce proteolisi enzimatica. Tali forme infatti risultano maggiormente presenti nelle cellule stimolate con PMA, mentre sono al limite del rilevabile nelle cellule non stimolate. Questo aspetto necessita ovviamente di ulteriori indagini.

L'analisi al citofluorimetro non ha messo in evidenza alcuna influenza del peptide pseudosubstrato sull'espressione della PKC- θ stessa, sulla morfologia cellulare, sulla vitalità e sulla mortalità delle cellule, né sull'espressione del CD41 e del CD 42.

I risultati ottenuti però indicano chiaramente che questo isoenzima svolge un ruolo molto importante nel processo endomitotico che dà origine alle cellule poliploidi. Le cellule trattate con PMA infatti non sono in grado di aumentare l'indice di poliploidia se stimolate in presenza dell'inibitore di PKC- θ . Esperimenti svolti in precedenza avevano messo in evidenza che PKC- θ si ritrova negli immunoprecipitati di α -tubulina, tuttavia non è risultato vero il contrario, ovvero non ci è stato possibile identificare la presenza di α -tubulina negli immunoprecipitati di PKC- θ . Lo stesso apparente paradosso si verifica nelle piastrine, come dimostrato dagli studi da me svolti nell'ambito del dottorato. Infine Banan et al., nel 2004 hanno pubblicato un lavoro sul "Journal of Biological Chemistry" in cui dimostrano che, in una linea cellulare intestinale, PKC- θ induce la fosforilazione della β -tubulina che compone i microtubuli, innescando fenomeni di iperpolimerizzazione microtubulare. Sempre in questo lavoro, gli autori dimostrano che l'inibizione dell'espressione di questa isoforma di PKC determina disassemblaggio dei microtubuli. Tenendo in considerazione queste evidenze, l'inibizione della formazione di cellule poliploidi causata dalla inibizione di PKC- θ lascia spazio all'ipotesi che nelle HEL PKC- θ svolga la sua azione pro-poliploidizzante agendo sui microtubuli che formano il fuso mitotico.

In conclusione è stato messo a punto un valido sistema sperimentale per studiare il differenziamento megacariocitico di progenitori mieloidi. Questo sistema può essere utilizzato per valutare ad esempio l'influenza di una qualche proteina, ormone o farmaco sul differenziamento megacariocitico. Altri studi in corso nel nostro laboratorio potranno d'ora in poi avvalersi di questo valido modello sperimentale per meglio comprendere i processi che conducono una cellula staminale a divenire un megacariociti.

Applicando questo sistema allo studio del ruolo di PKC- θ nel differenziamento, utilizzando un inibitore specifico, ci è stato possibile capire che l'isoforma θ di PKC svolge un ruolo positivo e fondamentale nel processo di poliploidizzazione.

BIBLIOGRAFIA

Andrews RK, Berndt MC: Adhesion-dependent signalling and the initiation of haemostasis and thrombosis. *Histol Histopathol* 13: 837-44. 1999.

Auer GU, Backdhal M, Forsslund GM, Askensten UG: Ploidy levels in nonneoplastic neoplastic thyroid cells. *Anal Quant Cytol Histol* 7: 97-106. 1985.

Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK: The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost* 86: 178-88. 2001.

Boudignon-Poudhon C, Patel PM, Parise LV: Phorbol ester enhances integrin α IIb β 3-dependent adhesion of human erythroleukemic cells to activation-dependent monoclonal antibodies. *Blood* Vol 87: 968-76. 1996.

Clemetson KJ: Platelet GPIb-V-IX complex. *Thromb Haemost* 78: 266-70. 1997

Datta NS, Williams JL, Long MW: Differential modulation of G1-S-phase cyclin-dependent kinase 2/cyclin complexes occurs during the acquisition of a polyploid DNA content. *Cell Growth Differ* 9: 639-50. 1998.

Dormann D, Clemetson KJ, Kehrel BE: The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood* 96: 2469-78. 2000.

Edgar BA, Orr-Weaver TL: Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105: 297-306. 2001.

Handin R, Lux S, Stossel T: *Blood – Principles and Practice of Hematology* (2nd Edition). Lippincot Williams & Wilkins.

Hong Y, Martin JF, Vainchenker W, Erusalimsky JD: Inhibition of protein kinase C suppresses megakaryocytic differentiation and stimulates erytroid differentiation in HEL cells. *Blood* Vol 87: 123-31. 1996.

Jackson C, Arnold J, Pestina T, Stenberg P: Megakaryocyte Biology. In: Kuter D, Hunt P, Sheridan W, Zucker-Franklin D, editors. *Thrombopoiesis and thrombopoietins: molecular, cellular, preclinical, and clinical biology*. Totowa, NJ: Humana Press, Inc. pp 3-30. 1997.

Kieffer N, Debili N, Wicki A, Titeux M, Henri A, Mishal Z, Breton-Gorius J, Vainchenker W, Clemetson KJ: Expression of platelet glycoprotein Ib alpha in HEL cells. *J Biol Chem*. Dec 5; 261:15854-62. 1986.

Kudryavtsev BN, Kudryavtseva MV, Sakuta GA, Stein GI: Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Arch B Cell Pathol Mol Pathol* 64: 387-93. 1993.

Nurden P, Puojol C, Nurden AT: The evolution of megakaryocytes to platelets. *Baillieres Clin Haematol* Feb. 10: 1-27. 1997.

Owens GK, Schwartz SM: Alterations in vascular smooth muscle mass in the spontaneously hypertensive rat. Role of cellular hypertrophy, huploidy and hyperplasia. *Circ Res* 51: 280-89. 1982.

Rajagopalan V, Essex DW, Shapiro SS, Konkle BA: Tumor necrosis factor-alpha modulation of glycoprotein Ib alpha expression in human endothelial and erythroleukemia cells. *Blood*. Jul 1; 80:153-61. 1992.

Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR: Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol* 190: 7-20. 2002.

Rosati P.: *Citologia ed Istologia*. EDI Ermes, 1987.

Roy L, Coullin P, Vitrat N, Hellio R, Debili N, Weinstein J, Bernheim A, Vainchenker W: Asymmetrical segregation of chromosomes with a normal metaphase/ anaphase checkpoint in polyploid megakaryocytes. *Blood* 97: 2238-47. 2001.

Saito H: Megakaryocytic cells lines. *Baillieres Clin Haematol* Feb. 10: 47-63. 1997.

Sanritter W, Scomazzoni G: Deoxyribonucleic acid content (Feulgen photometry) and dry weight (interference microscopy) of normal and hypertrophical heart muscle fibres. *Nature* 202: 100-1. 1964.

Tabilio A, Rosa JP, Testa U, Kieffer N, Nurden AT, Del Canizo MC, Breton-Gorius J, Vainchenker W. *EMBO J*. 3, 453-59. 1984.

Taniguchi T, Endo H, Chikatsu N, Uchimarui K, Asano S, Fujita T, Nakahgata T, Motokura T: Expression of p21 (Cip1/Waf1/Sdi1) and p27 (Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitors during human haematopoiesis. *Blood* 93: 4167-78. 1999.

Vittet et al.: *Exp Haematol* Oct. 20: 1129-34. 1992.

Ylännä J, Hormia M, Järvinen M, Vartio T, Virtanen I: Platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in cultured cells. localization in focal adhesion sites in spreading HEL cells. *Blood* Vol 72: 1478-86. 1988.

Zauli G, Bassini A, Catani L, Gibellini D, Celeghini C, Borgati P, Caramelli E, Guidotti L, Capitani S: PMA-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells is accompanied by striking modifications of protein kinase C catalytic activity and isoform composition at the nuclear level. *Brit J Haematol* 92: 530-36. 1996.

Zimmet JM, Jackson CW, Stenberg PE, Ladd D, Ravid K: A role for cyclin D3 in the endomitotic cell cycle. *Mol Cell Biol* 17: 7248-59. 1997.

SEMINARI

PROLIFERATION OF HUMAN OLIGODENDROCYTE PROGENITORS FROM THE ADULT BRAIN IN LONG-TERM CULTURE *and* MULTIPLEX ROLE OF NITRIC OXIDE IN MULTIPLE SCLEROSIS

Anne Boullerne, University of Chicago, Department of Neurology

30 Settembre 2003 alle ore 12.00

PHARMACOGENETICS: A TOOL FOR A MORE EFFICIENT AND SAFE DRUG THERAPY

Prof Magnus Ingelman-Sundberg Direttore del Division of Molecular Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, di Stoccolma

30/01/2004 alle ore 14.30

"ALTERAZIONI DEL GENE DELLA PERFORINA NELLE PATOLOGIE LINFOPROLIFERATIVE"

Rita Clementi (Universita' di Pavia)

3 febbraio alle ore 14

"TNF, ANTI-TNF ED AUTOIMMUNITÀ".

Prof. Guido Valesini (Cattedra di Reumatologia, Universita' la Sapienza di Roma)

10 marzo alle ore 11

"ESPRESSIONE EPATO-SPECIFICA DEL FATTORE IX ANTIEMOFILICO MEDIANTE L'USO DI VETTORI LENTIVIRALI"

Antonia Follenzi, Albert Einstein College of Medicine, Liver Research Center

Mercoledì 31 Marzo 2004 alle ore 11.00

"GENETIC BASES OF THE AUTOIMMUNE LYMPHOPROLIFERATIVE SYNDROME (ALPS) SUBTYPES".

Frédéric Rieux-Laucat, Hôpital Necker, Paris

3 maggio alle ore 14

"BIOMEDICAL DISCOVERY USING MICROARRAYS: PRINCIPLES, PROSPECTS AND PROBLEMS".

David Murphy, Università di Bristol, Dipartimento di Neuroscienze e Neuroendocrinologia.

14-16 Giugno 2004

"FUNCTIONAL GENOMICS OF HYPOTHALAMIC HOMEOSTATIC PLASTICITÀ"

David Murphy, Università di Bristol, Dipartimento di Neuroscienze e Neuroendocrinologia.

14-16 Giugno 2004

"LE ARTRITI CRONICHE DEL BAMBINO"

Alberto MARTINI Istituto Scientifico Gaslini e Università di Genova

20 maggio 2004 ore 14

"IL RETICOLO ENDOPLASMATICO: UN LABIRINTO METABOLICO"

Prof. Angiolo BENEDETTI, Dipartimento di Fisiopatologia e Medicina Sperimentale dell'Università di Siena

Venerdì 28 Maggio 2004, ore 14.30

"VIRUS E MALATTIE AUTOIMMUNI"

Antonio PUCCETTI, Università di Genova
25 maggio 2004, ore 11

"BIOMEDICAL DISCOVERY USING MICROARRAYS: PRINCIPLES, PROSPECTS AND PROBLEMS"

David Murphy, University of Bristol
Lunedì 14 Giugno 2004 ORE 12.00

"FUNCTIONAL GENOMICS OF HYPOTHALAMIC HOMEOSTATIC PLASTICITÀ"

David Murphy, University of Bristol
Martedì 15 Giugno 2004 ORE 12.00

PI 3-KINASE γ CONTROLS CARDIAC CONTRACTILITY AND HYPERTROPHY THROUGH KINASE-DEPENDENT AND INDEPENDENT FUNCTIONS

Prof. Emilio Hirsch, Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica, Torino
Martedì 29 giugno

"ETHANOL METABOLISM AND TOXICITY IN PREGNANCY"

Martin Ronis del Dept of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, (USA)
Mercoledì 7 Luglio 2004 alle ore 14.

"CUSHING'S SYNDROME IN CHILDHOOD"

Martin O. Savage, St. Bartholomew's Hospital and the Royal School of Medicine and Dentistry, London
Lunedì 20 settembre 2004 ore 16

"MECCANISMI PATOGENETICI DELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA"

Prof. Manlio Ferrarini
mercoledì 30 giugno alle ore 14 in aula magna.

"FROM THE BENCH TO THE BEDSIDE: GALECTIN-3 IMMUNODETECTION FOR IMPROVING THE PREOPERATIVE DIAGNOSIS OF THE FOLLICULAR THYROID LESIONS"

A. Bartolazzi
5/07/2004 alle ore 15

Partecipazione a congressi

Convegno Annuale della Sezione Ligure–Lombardo-Piemontese della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare

Novara, 23 Maggio 2003

"Localizzazione subcellulare di PKC theta e suo ruolo nel controllo della morfologia piastrinica".

Pietrapiana D., Piranda D., **Passalacqua M.**, Lova P., Reineri S., Canobbio I., Bertoni A., Graziani A., Torti M., Sinigaglia F.

(Pag. 8)

VI Congresso Nazionale di biotecnologie (CNB₆)

Padova, 4/5/6 Giugno 2003

"Oestrogens influence platelet function through the formation of a Src-dependent signal transduction complex mediated by a membrane-associated oestrogen-receptor beta".

Reineri S., Piranda D., **Pietrapiana D.**, Bertoni A., Lova P., Torti M., Canobbio I., Moro L., Sinigaglia F.

(Pag. 121)

48° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare S.I.B.

Ferrara, 15-18 Settembre 2003

"Oestrogen receptor beta localizes in the membrane of human platelets and mediates a signal transduction pathway which results in a potentiation of agonist-dependent platelet activation".

Piranda D., Reineri S., **Pietrapiana D.**, Bordone R., Bertoni A., Lova P., Canobbio I., Torti M., Moro L., Sinigaglia F.

(Pag.102)

48° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare S.I.B.

Ferrara, 15-18 Settembre 2003

"Study of θ -PKC sub-cellular localization in human platelets and of its role in platelet function".

Pietrapiana D., Reineri S., Lova P., Bertoni A., Passalacqua M., Graziani A., Canobbio I., Torti M., Sinigaglia F.

IV Riunione, Gruppo Studio Piastrine

Conegliano Veneto (Treviso), 2-4 Ottobre, 2003

Gli estrogeni potenziano la risposta piastrinica agli agonisti

Reineri S., Piranda D., Lova P., **Pietrapiana D.**, Migliaretti A., Canobbio I., Bertoni A., Torti M., Moro L., Sinigaglia F.

IV Riunione Gruppo Studio Piastrine

Conegliano Veneto (Treviso), 2-4 Ottobre, 2003

"Gli estrogeni potenziano la risposta piastrinica agli agonisti".

Reineri S., Piranda D., Lova P., **Pietrapiana D.**, Migliaretti A., Canobbio I., Bertoni A., Torti M., Moro L., Sinigaglia F.

Congresso Associazione Biologia Cellulare e del Differenziamento-"Meccanismi di traduzione del segnale in adesione e differenziamento cellulare"

Roma 19-20 Marzo 2004.

"17-beta oestradiol potentiates thrombin-dependent platelet aggregation and exposition to fibrinogen binding sites on platelets surface. Role of oestrogen-receptor beta and src kinase in this process".

Reineri S., Moro L., Piranda D., **Pietrapiana D.**, Lova P., Bertoni A., and Sinigaglia F.

Convegno Annuale della Sezione Ligure–Lombardo-Piemontese della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare

Novara 14 Maggio 2004

17-beta oestradiol potentiates thrombin-dependent α IIb β 3 activation and platelet aggregation

Reineri S., Moro L., Piranda D., **Pietrapiana D.**, Lova P., Bertoni A., Torti M., Sinigaglia F.

10th ERFURT Conference on Platelets (organised on behalf of the European Platelet Group)

Erfurt, Germany 19-23 Giugno 2004

17-beta oestradiol potentiates thrombin-dependent α I**IIb** β 3 activation and platelet aggregation.
S.Reineri, L.Moro, D.Piranda, **D.Pietrapiana**, P.Lova, A.Bertoni, M.Torti, F.Sinigaglia
(pag.25)

VII Congresso Nazionale di biotecnologie (CNB₇)

17-beta oestradiol potentiates thrombin-dependent α I**IIb** β 3 activation and platelet aggregation.
S.Reineri, L.Moro, D.Piranda, **D.Pietrapiana**, P.Lova, A.Bertoni, M.Torti, F.Sinigaglia
Catania, 8-10 Settembre 2004

49° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare-SIB-

Riccione, 28 Settembre-1 Ottobre 2004

“Study of the mechanism by which 17β -estradiol potentiates α I**IIb** β 3 activation and platelet aggregation induced by thrombin or thromboxane A₂”.

S.Reineri, D.Piranda, **D.Pietrapiana**, P.Lova, A.Bertoni, M.Torti, F.Sinigaglia

Publicazioni

Non-genomic effects of 17{beta}-estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor {beta} and Src kinase.

Moro L, Reineri S, Piranda D, **D.Pietrapiana**, P.Lova, A.Bretoni, Graziani A, Defilippi P, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F.

Blood. 2004 Jun 15 [Epub ahead of print]